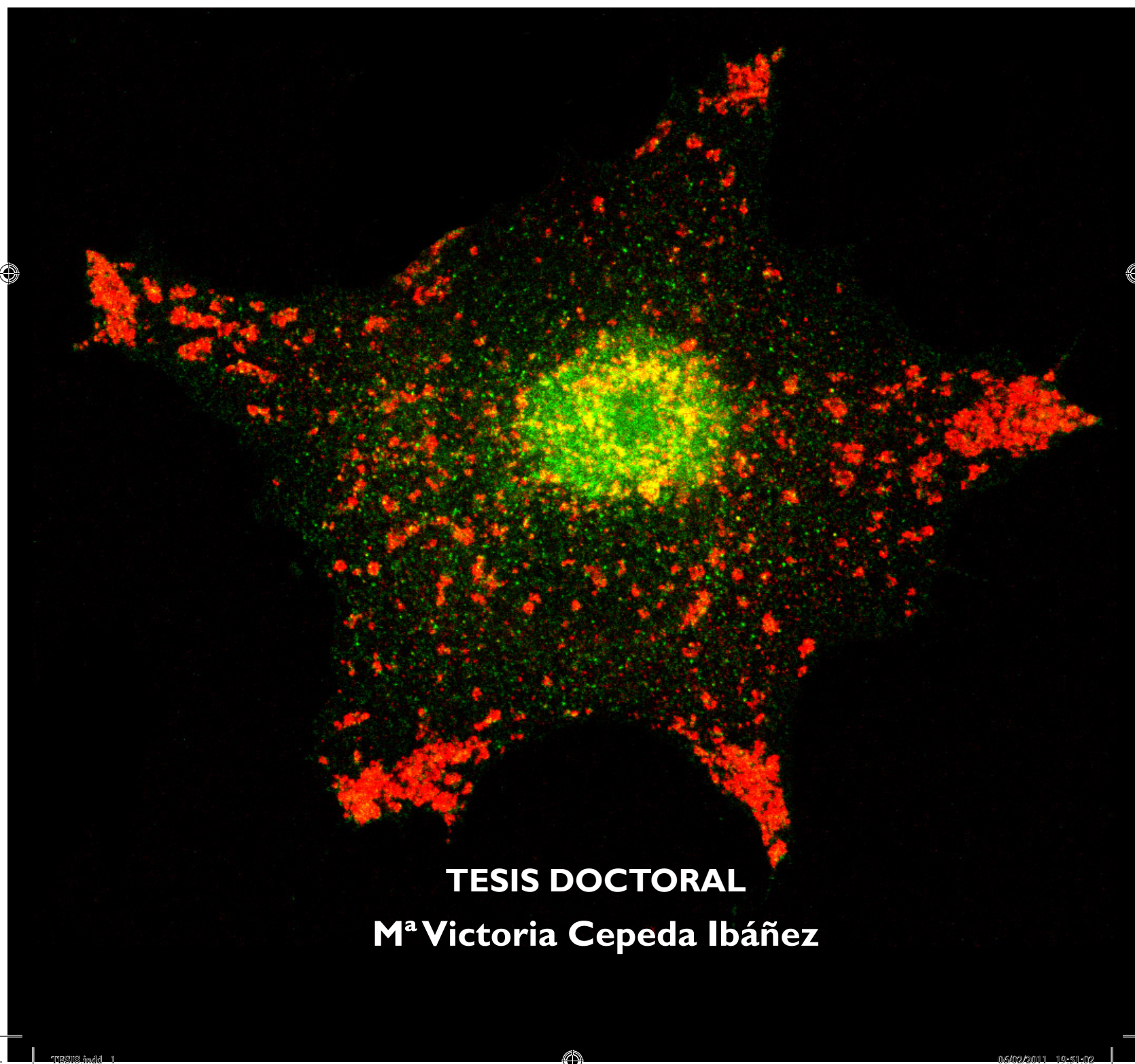


FACULTAD DE CIENCIAS - Departamento de Biología Molecular

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Caracterización de las interacciones del citomegalovirus humano con las membranas celulares



TESIS DOCTORAL
M^a Victoria Cepeda Ibáñez





Agradecimientos...

Han sido muchas las personas que a lo largo de estos años me han apoyado y ayudado a lo largo de este camino. Sin ellas, este recorrido no habría sido posible y este ciclo no se habría completado.

En primer lugar, quiero agradecerle a José Manuel Pérez la confianza que depositó en mi abriéndome este camino de la tesis y guiándome durante mis primeros pasos. De él aprendí que lo más importante es disfrutar día a día del trabajo que se realiza y de las personas que forman parte del proceso. De una forma muy especial, quiero dar las gracias a Alberto Fraile por aceptar el desafío de dirigir mi tesis doctoral en un espacio de tiempo corto. Han sido muchas, muchas las cosas que he aprendido a lo largo de estos años, pero lo más importante ha sido el valor del trabajo bien hecho, la autoexigencia y el afrontar los desafíos y los retos sin miedo y con confianza. Muchas gracias por haberme enseñado y apoyado durante todo este tiempo.

Una de las técnicas más bonitas que he tenido la oportunidad de explorar en este periodo ha sido la microscopía electrónica. En este camino, tuve la suerte de contar con la ayuda de varias personas para aprender y desarrollar esta técnica: Cristina Risco del Centro Nacional de Biotecnología (CNB), Maite Rejas y Milagros Guerra del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), Carmen López, y su equipo de la unidad de criomicroscopía electrónica de los Servicios Científicos y Tecnológicos (SCT) de la Universidad de Barcelona, especialmente Nieves Hernández y Gema Martínez, y Annegret Pelchen-Matthews del “Medical Research Council” (MRC) en Londres. A todas os debo el placer de haber descubierto y disfrutado el trabajo realizado aplicando la microscopía electrónica a la biología celular. Muchas gracias.

También me gustaría dar las gracias al equipo de Sylvia Gutiérrez en el servicio de microscopía confocal del CNB: Pepe Coll, Susana Hernández y Ana Carla García. Gracias a todos por las horas compartidas en el microscopio, por las charlas y el buen humor que siempre dispensáis a los que nos acercamos por “la pecera”. Del mismo modo, extiendo mi agradecimiento al equipo de M^a del Carmen Moreno-Ortiz en el servicio de Citometría de Flujo en el CNB: Sara Escudero y Pablo García y Sonia Rodríguez y al equipo de Fernando Carrasco en el servicio de genómica del CBMSO: especialmente a Laura Tabera y Sandra Gonzalo. Nuestros colaboradores en el extranjero nos prestaron generosamente reactivos claves para llevar a cabo este trabajo; me gustaría destacar la aportación de Gavin Wilkinson y a Vincent Emery por facilitarnos la cepa recombinante del CMVH que expresa la GFP, RecCMV, y la cepa Towne del CMVH, respectivamente.

Este camino que hoy se completa ha estado repleto, como todos los caminos, de tramos amplios y sencillos de caminar y de tramos que transcurrieron por terreno escabroso o por bosques oscuros. En ningún momento del recorrido estuve sola. La presencia de mis compañeros y mis amigos ha sido importantísima durante todo este tiempo. Gracias a mis antiguos compañeros del CBMSO, por el buen humor que derrochabais y las fiestas compartidas, a mis compañeros del laboratorio I12 por animarme y hacerme reír, a mis compañeros del laboratorio I11 por su cercanía y por las conversaciones compartidas. A todos vosotros os agradezco vuestra sincero apoyo, que nunca me ha faltado cuando lo he necesitado.





También recuerdo con mucho cariño a mis compañeros del laboratorio S6, en especial a Laura Sanz, Eva Sanmartín y Elia Diestra, y agradezco su alegría y su amistad. Laura, gracias por estar siempre ahí para tomar un café o charlar. Porque estabais vosotras, este camino ha resultado mucho más agradable.

También a mis compañeras de piso y amigas en San Bernardino me acompañaron en este tiempo, cuántos años de compartir y de reír y llorar juntas, hicisteis que las alegrías fueran más y las penas menos: Nuria, Fleur, Sibely, Celia, Ana, Andrea, Carmen y todas las demás. A mis amigas creativas y creadoras, Raquel y María José, gracias por ayudarme a dar alas a algunos de mis sueños, con vosotras a mi lado la imaginación me ha acompañado en mi sendero. A Cristina García, por su amistad, su apoyo, y la preciosa maquetación de esta tesis, ¡artista! A Pilar del Amo y a José Ovidio García, por su valiosa ayuda y cariño.

Por último, un gracias desde el alma a Carlos “Valti”, mi mejor amigo y cómplice en estos años. Sabes bien que, en gran medida, gracias a ti he conseguido alcanzar finalmente mi meta. Gracias por tu inmensa paciencia y tu enorme corazón. También gracias a “Mar” y a “Odín” por hacerme reír y por animarme cada día con sus maullidos y ronroneos.

Me gustaría dedicar este trabajo a mis padres, Miguel Ángel y Ana María, porque no cabría ni en 100 páginas lo que tengo que agradecerles en el camino de la vida.

Con todo mi cariño... esta tesis es para vosotros.





ÍNDICE

Summary	11
Introducción	15
I El citomegalovirus humano (CMVH)	
1.1 La familia de los herpes-virus. El citomegalovirus humano	17
1.2 El CMVH como importante patógeno humano	18
1.3 Características y ciclo de vida del CMVH	19
1.3.1 La naturaleza del lugar de ensamblaje del CMVH	21
1.3.2 Interacción del CMVH con los sistemas de membranas celulares	22
2 Los sistemas de membranas celulares y el tráfico intracelular	
2.1 La ruta exocítica	24
2.2 La ruta endocítica	25
2.3 Transporte mediado por vesículas	27
2.3.1 El ciclo de fusión de membranas y la familia de proteínas SNAREs	28
2.3.2 Las sub-familia de las syntaxinas. La syntaxina 3	29
Objetivos	31
Materiales y métodos	35
1 Reactivos y anticuerpos	36
2 Células y virus	37
3 PCR cuantitativa a tiempo real	38
4 Ensayos de inmunofluorescencia	39
5 Inmuno-marcaje de criosecciones y de virus aislados para ME	40
6 Ensayos de inmuno-precipitación de virus	41
7 Análisis de la producción del CMVH en las células BJI que expresan los shRNAs o la construcción STX3-c-myc	42
8 Análisis de la producción del VHS-I en las células MeWo que expresan los shRNAs	42





9 Western blot	43
10 Análisis de monocapas de células infectadas por el CMVH mediante ME	44
11 Análisis de pulso y caza de CD63	44

Resultados

I Caracterización de la naturaleza de los compartimentos celulares donde se ensambla el CMVH	
1.1 Diferentes marcadores celulares de las rutas exocítica y endocítica se reclutan al lugar de ensamblaje viral en las células infectadas por el CMVH	47
1.2 El CMVH altera la transcripción y la expresión de algunos marcadores celulares	52
1.3 Algunos marcadores celulares se encuentran incorporados en la envoltura del CMVH	55
1.4 Precipitación de los virus infectivos con anticuerpos contra proteínas celulares	60
2 Identificación de componentes celulares implicados en las etapas finales de ensamblaje del CMVH	
2.1 La infección por el CMVH induce la expresión de la proteína syntaxina 3	61
2.2 La STX3 está localizada en la membrana plasmática y en la zona de ensamblaje viral, y se incorpora a la envoltura del CMVH	61
2.3 El silenciamiento de la STX3 en células infectadas por el CMVH causa una disminución en la producción total de virus, pero no afecta a la producción viral del VHS-I	66
2.4 El análisis ultra-estructural de monocapas de células infectadas con CMVH y silenciadas para la STX3, revela alteraciones en la morfogénesis viral	69
2.5 El silenciamiento de la STX3 reduce la expresión de los marcadores de MVBs/lisosomas	69

Discusión

Conclusiones

Bibliografía



ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA 1	Tomografía electrónica del herpes-virus herpes simplex tipo I	17
FIGURA 2	Modelo de la morfogénesis del CMVH	20
FIGURA 3	Modelo de los sistemas de membranas celulares	24
FIGURA 4	Modelo del transporte mediado por vesículas	27
FIGURA 5	Modelo de la estructura del complejo SNARE	28
FIGURA 6	Localización subcelular de los marcadores de la ruta exocítica gigantina y TGN46 en las células infectadas por el CMVH	47
FIGURA 7	Localización subcelular de los marcadores de endosomas EEA1, HRS y anexina I en las células infectadas por el CMVH	48
FIGURA 8	Localización subcelular de los marcadores de los endosomas de reciclaje (el receptor de la transferrina, TfR), de los MVBs (CD63) y de los lisosomas (Lamp1) en las células infectadas por el CMVH	49
FIGURA 9	Localización subcelular de los marcadores de los receptores de la manosa-6-fosfato (M6PRs) en las células infectadas por el CMVH	51
FIGURA 10	Examen de marcadores celulares en los lisados y en los sobrenadantes de las células infectadas por el CMVH	53
FIGURA 11	Regulación transcripcional de los marcadores celulares durante la infección por el CMVH	54
FIGURA 12	Examen de los marcadores celulares en los viriones purificados del CMVH	54
FIGURA 13	Localización mediante inmuno-marcaje con oro de proteínas virales y celulares en la envoltura de partículas virales aisladas	56
FIGURA 14	Inmunoprecipitación de partículas virales con anticuerpos anti-TGN46 y anti-CD63	58
FIGURA 15	Expresión y localización subcelular de la sintaxina 3 (STX3) en las células infectadas por el CMVH	62
FIGURA 16	Expresión y localización subcelular de la sintaxina 3 (STX3) exógena en las células infectadas por el CMVH que expresan la construcción STX3-c-myc	62
FIGURA 17	Inmuno-localización de la sintaxina 3 (STX3) exógena mediante microscopía electrónica en las células infectadas por el CMVH que expresan la construcción STX3-c-myc	63



FIGURA 18	Inmuno-localización de la sintaxina 3 (STX3) mediante microscopía electrónica en las envolturas de los viriones aislados	64
FIGURA 19	Expresión de la sintaxina 3 (STX3) en las células MeWo que expresan los shRNAs anti-STX3	65
FIGURA 20	Ensayos funcionales de producción del CMVH mediante el silenciamiento de la sintaxina 3 (STX3)	66
FIGURA 21	Ensayos funcionales de producción del VHS-I mediante el silenciamiento de la sintaxina 3 (STX3)	68
FIGURA 22	Análisis de monocapas de células infectadas por el CMVH que expresan los shRNAs control o anti-STX3 incluídas “ <i>in situ</i> ”	71
FIGURA 23	Expresión de marcadores de MVBs/lisosomas en células que expresan los shRNAs control o anti-STX3 en células parentales o que expresaban la construcción STX3-c-myc	72
FIGURA 24	Modelo de la morfogénesis del CMVH	80
TABLA I	Inmuno-marcaje con oro y ME de viriones y cuerpos densos	57
TABLA 2	Cuantificación de las partículas virales en el lugar de ensamblaje reconstruído en las monocapas de las células control o silenciadas para la STX3 infectadas con el CMVH	70



ABREVIATURAS

- **ADNc:** ADN complementario
- **AMPc:** AMP cíclico
- **CD-M6PR:** receptor de la manosa-6-fosfato dependiente de cationes (“*cation-dependent mannose-6-phosphate receptor*”)
- **CHC:** cadena pesada de la clatrina (“*clathrin heavy chain*”)
- **CI-M6PR:** receptor de la manosa-6-fosfato independiente de cationes (“*cation-independent mannose-6-phosphate receptor*”)
- **CMVH:** citomegalovirus humano
- **DAB:** diaminobencidina
- **DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol
- **DB:** cuerpos densos (“*dense bodies*”)
- **EEA1:** antígeno-I de endosomas tempranos (“*early endosome antigen-1*”)
- **EM:** espectrometría de masas
- **ESCRT:** el complejo celular endosomal de clasificación necesario para el transporte (“*the cellular endosomal sorting complex required for transport*”)
- **FCS:** suero fetal de ternera (“*fetal calf serum*”)
- **FIP4:** familia de la proteína de interacción 4 (“*family of interacting protein 4*”)
- **GFP:** la proteína verde fluorescente (“*Green Fluorescent Protein*”)
- **HA:** hemaglutinina de la gripe humana (“*human influenza hemagglutinin*”)
- **HRP:** la peroxidasa de rábano (“*Horseradish Peroxidase*”)
- **HRS:** el sustrato de la tirosina quinasa regulado por el factor de crecimiento de hepatocitos (“*hepatocyte growth factor-regulated Tyr-kinase substrate*”)
- **HSV-6:** herpes-virus humano 6
- **HSV-7:** herpes-virus humano 7
- **HSV-8:** herpes-virus humano 8
- **IF:** inmuno-fluorescencia
- **kDa:** kiloDalton
- **MHC:** complejo mayor de histocompatibilidad (“*major histocompatibility complex*”)
- **MCP:** proteína mayoritaria de la cápsida (“*major capsid protein*”)
- **MDI:** multiplicidad de infección
- **ME:** microscopía electrónica
- **MNE:** membrana nuclear externa





- **MNI:** membrana nuclear interna
- **MP:** membrana plasmática
- **MTOC:** centro organizador de microtúbulos (“*microtubule organising center*”)
- **M6P:** manosa-6-fosfato (“*mannose-6-phosphate*”)
- **NIEPs:** partículas envueltas no infecciosas (“*non-infectious enveloped particles*”)
- **NSF:** factor sensible a la N-etil-maleimida (“*N-ethylmaleimide sensitive factor*”)
- **PAG:** proteína A acoplada con oro
- **PBS:** búfer fosfato salino (“*phosphate-buffered saline*”)
- **PE:** ficoeritrina (“*phycoeritrin*”)
- **PFA:** para-formaldehído
- **qRT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (“*polimerase chain reaction*”, PCR) a tiempo real (“*real time PCR*”, RT-PCR) de forma cuantitativa (“*quantitative RT-PCR*”)
- **RE:** retículo endoplásmico
- **RecCMV:** variante recombinante de la cepa AD169 del CMVH
- **shRNAs:** ARNs ahorquillados cortos (“*short-hairpin RNAs*”)
- **SNAP:** proteína de anclaje al NSF soluble (“*Soluble NSF-Anchorage Protein*”)
- **SNAREs:** receptores de SNAP (“*SNAP Receptors*”)
- **SNC:** sistema nervioso central
- **STX3:** syntaxina 3
- **TfR:** receptor de la transferrina (“*transferrin receptor*”)
- **TGN:** red del trans-Golgi (“*trans-Golgi-network*”)
- **VAMPs:** proteínas de membrana asociadas a la vesícula, (“*Vesicle Associated Membrane Proteins*”)
- **VEB:** virus Epstein-Barr
- **VHS-1:** virus herpes-simplex tipo 1
- **VHS-2:** virus herpes-simplex tipo 2
- **VPR:** virus de la pseudo-rabia
- **VVZ:** virus varicela-zoster
- **WB:** Western blot





summary







The human cytomegalovirus (HCMV) is dependent on interaction with intracellular membranes systems prior to its secretion. However, the nature of these membranes and the mechanisms underlying these processes are poorly understood.

It is thought that HCMV acquires its final envelope from the trans-Golgi-network (TGN), or from endocytic membranes. Here we studied the localization of cellular markers in HCMV-infected cells and in isolated viruses. Immunofluorescence staining indicated that HCMV recruits TGN and endosomal markers to the virus factory. Immuno-gold labelling of isolated viral particles demonstrated the incorporation of TGN46, endosomal markers early endosomal antigen 1, annexin I, transferrin receptor and CD63, and the cation-independent mannose 6-phosphate receptor, which traffics between the TGN and endosomes into the viral envelope. Virus immunoprecipitation assays demonstrated that virions containing TGN46 and CD63 were infectious. This study reconciles the apparent controversy regarding the nature of the HCMV assembly site and suggests that HCMV has the ability to generate a novel membrane compartment containing markers for both TGN and endosomes, or that this membranes may be vesicles in transit between the TGN and endosomes.

Here, we show that HCMV infection induces expression of the soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) syntaxin 3 (STX3), a component of the cellular machinery for membrane fusion. STX3 was located at the plasma membrane and at the assembly site where it was found associated with virus wrapping membranes by immuno-gold labelling. Depletion of STX3 using RNA interference reduced HCMV production, while expression of a STX3 construct resistant to RNAi inhibition enhanced virus production. Ultrastructural examination of the assembly site in HCMV-infected STX3 depleted cells showed fewer mature virions and more viruses undergoing final envelopment. In contrast, silencing of STX3 did not affect herpes simplex virus type-1 production. The mechanism through which STX3 affected HCMV morphogenesis likely involved multi vesicular bodies (MVBs)/lysosomes since STX3 depletion reduced the expression of lysosomal membrane glycoproteins. Our results demonstrate a function for STX3 in HCMV morphogenesis, and unravel a new role for this SNARE protein in MVBs/lysosomes compartments.







introducción







I El citomegalovirus humano (CMVH)

I.1 La familia de los herpes-virus. El citomegalovirus humano.

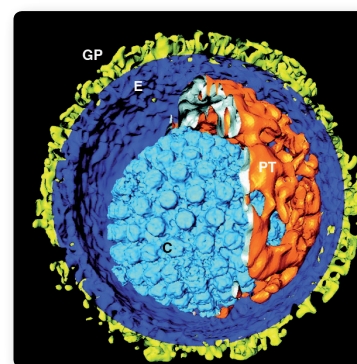
La familia de los herpes-virus se formó inicialmente basada en criterios morfológicos; así, se clasificaron como herpes-virus aquellos que comparten una estructura común que consiste en una cápsida icosaédrica que contiene un ADN lineal de doble cadena, inmersa en un material asimétrico y amorfo conocido como el tegumento que se encuentra rodeado por una envoltura con las glicoproteínas virales dispuestas en su superficie (Mocarski *et al.*, 2007). Más adelante, se estableció una clasificación adicional basada en criterios de similitud de secuencia de nucleótidos y se estableció un nuevo orden, los *Hespesvirales*, que comprende 3 familias: los herpes-virus que infectan a los mamíferos, aves y reptiles o *Herpesviridae*, y las recientemente designadas familias *Alloherpesviridae* cuyos miembros infectan a los peces y anfibios, y *Malacoherpesviridae*, que infectan bivalvos. Dentro de la familia *Herpesviridae* existen además 3 sub-familias llamadas α - β - y γ -herpesvirinae, clasificadas en función a sus características biológicas en cuanto a hospedador y ciclo vital. Los α -herpesvirinae poseen un rango de hospedador muy variable, un ciclo reproductivo corto y establecen infecciones latentes sobre todo en los ganglios sensoriales. Esta sub-familia contiene los géneros *Simplexvirus*, *Varicellovirus*, *Mardivirus* e *Iltovirus*. Los β -herpesvirinae tienen un rango de hospedador algo más restringido que los α -herpesvirinae, su ciclo reproductivo es largo y establecen infecciones latentes en las glándulas secretoras, en las células de riñón y en otros tejidos. Esta sub-familia comprende los géneros *Citomegalovirus*, *Muromegalovirus*, *Roseolovirus* y el recientemente descrito *Proboscivirus* (McGeoch *et al.*, 2006). Los γ -herpesvirinae infectan un rango de hospedadores muy restringido, e infectan sobre todo linfocitos T o B, y contienen dos géneros: los *Linfocryptovirus* y los *Radinovirus*.

Los herpes-virus establecen una infección generalmente no mortal en el hospedador y se encuentran ampliamente diseminados en la naturaleza; hasta la fecha se han identificado más de 200 diferentes. Entre ellos, se incluyen algunos de los patógenos humanos más importantes como el virus herpes-simplex tipo 1 y 2 (VHS-1, VHS-2), el virus varicela-zoster (VVZ), el virus Epstein-Barr (VEB), los herpes-virus humanos 6, 7 y 8 (HVH-6, HVH-7 y HVH-8), y el citomegalovirus humano (CMVH).

Como todos los herpes-virus, el CMVH es un virus con envoltura muy complejo a nivel estructural, cuya partícula viral contiene tanto componentes virales como celulares. La partícula viral del CMVH mide unos 200 nm de diámetro aproximadamente, lo que lo convierte en un virus de gran tamaño, y consta de una doble cadena de ADN de 235 pares de kilobases (pkb) incluida dentro de la cápsida, también llamada núcleo-cápsida (**Fig. I**).

Figura I

Tomografía electrónica del herpes-virus herpes simplex tipo I. Todos los herpes-virus comparten una estructura común que consiste en una cápsida icosaédrica (C, azul claro), las proteínas virales del tegumento (PT, naranja), la envoltura (E, azul oscuro) y las glicoproteínas virales (GP, amarillo).



Tomado de Grunewald *et al.* Science 2003





Introducción

El proteoma del CMVH ha sido analizado recientemente mediante una aproximación basada en la espectrometría de masas (EM) y se han identificado 59 proteínas (Varnum et al., 2004); entre ellas, 5 proteínas de la cápsida, 14 del tegumento, 19 glicoproteínas, 12 proteínas que participan en la replicación y en la transcripción del ADN viral y 9 proteínas aún sin caracterizar. Además, se han identificado hasta 70 proteínas celulares presentes en los viriones, tanto proteínas estructurales como enzimas, cuya función es aún desconocida y que podrían resultar importantes en términos de la infectividad viral. La nucleocápsida está compuesta por la proteína mayoritaria de la cápsida ("major capsid protein", MCP), presenta una simetría icosaédrica con un número de triangulación $T=16$ y 162 capsómeros, y se encuentra inmersa en un material proteico amorfo conocido como tegumento, que se localiza entre ésta y la envoltura viral. Las proteínas del tegumento realizan importantes tareas durante el ciclo de vida viral, tanto en la entrada y replicación viral como en la morfogénesis y la secreción de las partículas virales. La envoltura procede de las membranas de la célula huésped y es una bicapa lipídica donde se insertan las glicoproteínas virales. Éstas son claves para la replicación viral, especialmente en las etapas iniciales del ciclo de vida del virus, como la unión a la membrana celular y la entrada en la célula.

1.2 El CMVH como importante patógeno humano.

El citomegalovirus humano es un virus muy extendido entre la población a nivel mundial; en los países desarrollados la prevalencia del CMVH se encuentra en torno al 40-80% de la población mientras que en los países en vías de desarrollo está aproximadamente entre el 90-100% (Nyholm, 2010 #382). La infección por el CMVH requiere el contacto directo con secreciones corporales infectadas y apenas causa síntomas clínicos entre la población adulta sana e inmunocompetente más allá de una mononucleosis ocasional. Tras la infección primaria, el virus establece una infección latente en el hospedador y se puede reactivar de forma periódica llevando a cabo el ciclo de replicación viral (Alford et al., 1990). Los reservorios de latencia del CMVH comprenden diferentes tipos celulares como las células epiteliales de las glándulas salivares y de los túbulos renales, las células endoteliales y los monocitos maduros circulantes en la sangre (Gerna et al., 2004). Sin embargo, cuando los mecanismos del sistema inmune para neutralizar el virus fallan, la infección por el CMVH se torna grave. Esto ocurre de manera frecuente en neonatos y en pacientes con el sistema inmune deprimido, como son los que sufren SIDA y los que han sido sometidos a transplantes de órganos, de médula o a quimioterapia (Lazzarotto et al., 2004).

La infección por el CMVH en mujeres embarazadas es la primera causa de infecciones congénitas en los neonatos. La transmisión del virus de la madre al feto puede suceder durante todo el período del embarazo, pero si ocurre durante las primeras 16 semanas, los daños neurológicos resultan más severos y consisten en retardo mental, para- y cuadriplejía, déficits auditivos, atrofia óptica y trastornos en la talla (Perlman et al., 1992, Lazzarotto et al., 2004).

Las infecciones persistentes o recurrentes en pacientes cuyo sistema inmune se encuentra comprometido, como los que sufren SIDA y los que han sido sometidos a transplantes de órganos, son causa de mortalidad. En las autopsias de pacientes con infección generalizada por el CMVH se han encontrado antígenos virales en el sistema nervioso central (SNC), en la retina, los pulmones, el tracto gastro-intestinal y los neutrófilos de la sangre. La infección por el CMVH puede causar en estos pacientes encefalitis y retinitis, neumonía, hepatitis y trastornos gastrointestinales (Gerna et al., 2004).





Recientemente se ha asociado la infección por el CMVH con el desarrollo de trastornos vasculares que incluyen la esclerosis vascular tras un transplante, la restenosis y la aterosclerosis. Por otro lado, también se ha asociado la infección por el CMVH con ciertos tipos de cáncer como son el glioma maligno, el cáncer de colon, y el cáncer de próstata, si bien el mecanismo que subyace a este proceso es desconocido (Soroceanu et al., 2010).

Actualmente existen algunos fármacos antivirales para el tratamiento de las infecciones por el CMVH basados en la inhibición de la ADN polimerasa viral durante la infección primaria o durante la reactivación, pero que no tienen efecto sobre el virus cuando éste se encuentra en la fase latente. Estos compuestos se usan de forma muy limitada debido a su alta toxicidad (Baldanti et al., 2004). Un problema adicional es la selección de cepas del CMVH resistentes a los antivirales tras algunas semanas o meses de tratamiento, limitando aún más su utilización. Debido a estas restricciones, es importante desarrollar nuevos compuestos que inhiban la replicación viral; por ello, avanzar en el conocimiento de la biología celular del CMVH, tema de este trabajo de tesis doctoral, es esencial para identificar dianas moleculares que posibiliten el diseño de nuevos fármacos antivirales.

1.3 Características y ciclo de vida del CMVH.

Los virus son organismos muy sencillos que contienen una cantidad muy limitada de material genético, por lo que necesitan infectar a una célula hospedadora para poder replicarse. El CMVH es capaz de infectar “*in vivo*” un abanico amplio de tipos celulares, incluyendo células endoteliales, epiteliales, células del músculo liso, fibroblastos, neuronas, macrófagos y monocitos (Plachter et al., 1996, Mocarski et al., 2007). Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre la replicación del virus se llevaron a cabo “*in vitro*” en fibroblastos humanos con las cepas de laboratorio del CMVH adaptadas para su propagación en este tipo celular, como son la cepa “AD169” y la cepa “Towne”, las cuales han perdido la capacidad de replicarse de forma eficiente en células endoteliales o monocitos (Sinzger et al., 1999).

El ciclo de vida del CMVH es muy largo. La primera etapa consiste en la entrada del virus en la célula huésped. El mecanismo de entrada difiere en función del tipo celular infectado; el virus penetra en las células epiteliales y endoteliales por endocitosis (Bodaghi et al., 1999, Ryckman et al., 2006), mientras que en los fibroblastos, el CMVH entra mediante un proceso que comprende dos pasos: la unión del virus a la superficie celular y la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática (Compton et al., 1992, Isaacson et al., 2008). El CMVH se une a receptores específicos celulares como son el receptor del factor de crecimiento epidérmico, el receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas y ciertas moléculas de adhesión celular como las integrinas (Feire et al., 2004) a través de las glicoproteínas virales: gB, el complejo gH-gL-gO y el complejo gM-gN. En cualquier caso, el paso siguiente consiste en la liberación de la núcleo-cápsida al citoplasma celular y en su transporte, mediante su asociación con elementos del citoesqueleto a través de proteínas virales del tegumento (Ogawa-Goto et al., 2003), hasta los poros de la membrana nuclear, por donde las núcleo-cápsidas liberan el DNA viral al núcleo. La expresión de los genes virales se realiza de manera coordinada en varias etapas. Algunas de las proteínas presentes en los viriones internalizados son capaces de promover la transcripción de genes virales, como la proteína del tegumento viral pp71, que se transloca hasta el núcleo y activa la transcripción de los genes inmediatamente tempranos (Bresnahan et al., 2000, Schierling et al., 2004). La expresión de los genes



inmediatamente tempranos es independiente de la de los otros genes virales y sus productos modulan la replicación de los genes virales tempranos y tardíos (Pizzorno et al., 1988, Stenberg et al., 1990). Los productos de los genes tempranos son los responsables de la replicación del DNA viral y además regulan los mecanismos de defensa celular a la infección (Terhune et al., 2007). Las proteínas codificadas por los genes virales tardíos son las proteínas estructurales que formarán las partículas virales físicas durante la morfogénesis viral (Mocarski et al., 2007). Todo este proceso es largo, ya que no se detectan nuevas núcleo-cápsidas en el citoplasma hasta los 2 o 3 días tras la infección, y hasta los 4 días no se encuentran partículas virales en el medio extracelular. Después, los fibroblastos continúan produciendo nuevos viriones durante varios días (Mocarski et al., 2007).

La infección por el CMVH en células en cultivo genera 3 tipos diferentes de partículas: viriones maduros infectivos, partículas envueltas no infecciosas ("non-infectious enveloped particles", NIEPs), y cuerpos densos ("dense bodies", DB). Las NIEPs son estructuralmente idénticas a los viriones maduros, pero no contienen el ADN viral; los DBs reciben este nombre por su apariencia densa al microscopio electrónico, tienen tamaños muy variables y son acumulaciones globulares de proteínas del tegumento que tienen la capacidad de adquirir una envoltura membranosa y de secretarse al medio extracelular pero que no resultan infectivos.

El ensamblaje de las nuevas partículas virales del CMVH dentro de la célula huésped infectada es, como para todos los herpes-virus, un proceso complejo que se lleva a cabo en varias etapas diferenciadas y que en realidad resulta poco conocido. El modelo que está generalmente aceptado en el campo para la morfogénesis de los herpes-virus (**Fig. 2**) propone que las núcleo-cápsidas se ensamblan dentro del núcleo de la célula infectada a partir de una pro-cápsida que va madurando posteriormente y que está formada por 5 proteínas virales que se disponen alrededor de un precursor de la proteína de ensamblaje, cuya función consiste en iniciar el proceso de ensamblaje de la cápsida (Gibson, 1996). La maduración hasta núcleo-cápsida comprende la incorporación del ADN viral al interior de la pro-cápsida a través de un vértice de la misma o pentón especializado formado por 12 copias de la proteína portal o PORT, mediante la acción de una proteasa de maduración (Mocarski et al., 2007). Una vez ensambladas y maduras, las núcleo-cápsidas se trasladan hasta el citoplasma a través de las membranas nucleares donde sufren un

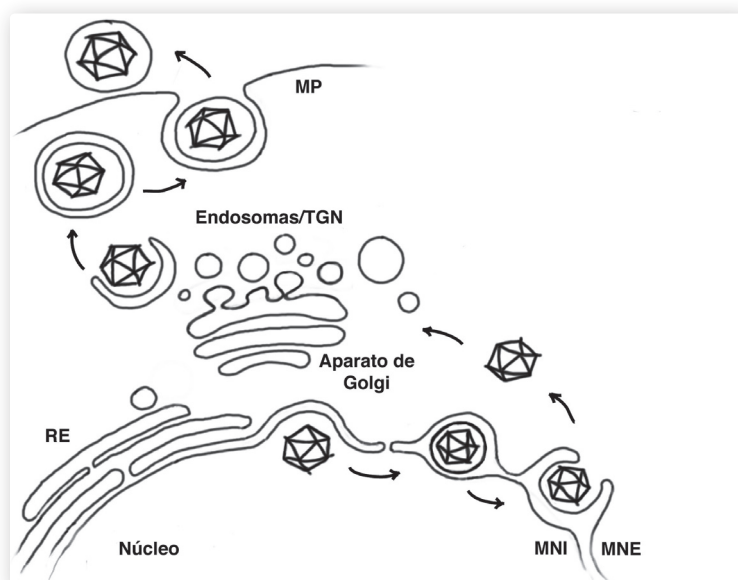


Figura 2

Modelo de la morfogénesis del CMVH. Las núcleo-cápsidas se ensamblan en el núcleo, viajan a través de las membranas nucleares/RE al citoplasma donde adquieren su envoltura, se trasladan hasta la membrana plasmática en una vacuola y allí se liberan los viriones maduros al espacio extracelular. MNI: membrana nuclear interna, MNE: membrana nuclear externa, RE: retículo endoplásmico, TGN: red del trans-Golgi, "trans-Golgi-network", MP: membrana plasmática.



primer proceso de envoltimiento en la membrana interna del núcleo y adquieren algunas de las proteínas del tegumento. Esta primera envoltura se pierde al fusionarse con la membrana nuclear externa o con la membrana del retículo endoplásmico y las núcleo-cápsidas se liberan al citoplasma; este proceso se conoce como envoltimiento/desenvoltimiento (Stackpole, 1969, Skepper et al., 2001). Una vez en el citoplasma, las núcleo-cápsidas se rodean de las proteínas del tegumento y adquieren la envoltura final de los sistemas de membranas celulares mediante su envoltimiento en túbulos membranosos o cisternas, quedando así la partícula viral envuelta dentro de una vacuola. Finalmente, los viriones maduros se transportan en el interior de la vacuola hasta la superficie de la célula donde son liberadas al medio extracelular mediante la fusión de la vacuola con la membrana plasmática (Mettenleiter et al., 2009, Mocarski et al., 2007).

Las etapas finales del ciclo de vida del CMVH como son la adquisición de la envoltura viral y la secreción de las partículas virales son más desconocidas que las etapas iniciales de expresión de los genes virales y del ensamblaje de la cápsida, y no están caracterizadas a nivel molecular.

1.3.1. La naturaleza del lugar de ensamblaje del CMVH.

Los análisis morfológicos mediante microscopía electrónica (ME) de células infectadas por el CMVH han puesto de manifiesto que la región celular donde las partículas virales adquieren su envoltura final, el denominado lugar de ensamblaje viral, está situado en la región perinuclear. Este área que generalmente se encuentra rodeada por aparatos de Golgi reorientados, concentra una gran cantidad de vesículas, túbulos y cisternas membranosas donde se envuelven las cápsidas virales (Severi et al., 1988).

Aunque la zona de ensamblaje viral se ha visualizado a nivel de microscopía, es poco lo que se conoce de ella a nivel estructural y molecular. Se han descrito como componentes de la zona de ensamblaje proteínas del tegumento, de la envoltura y proteínas no estructurales del virus (Margulies et al., 1996, Fraile-Ramos et al., 2002, Crump et al., 2003, Homman-Loudiyi et al., 2003, Prichard et al., 2005, Seo et al., 2006, Das et al., 2007, Krzyzaniak et al., 2007). Sin embargo, la caracterización completa a nivel molecular de esta estructura especializada en la producción de nuevos viriones resulta una tarea complicada debido a los profundos cambios tanto morfológicos como de expresión de proteínas que induce la infección por el CMVH (Das et al., 2007). A pesar de esto, la expresión de proteínas recombinantes fusionadas con la proteína verde fluorescente ("Green Fluorescent Protein", GFP) y el uso de anticuerpos ha permitido visualizar ciertos marcadores celulares de la ruta exocítica de secreción celular, de la región intermedia entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, y de los compartimentos del aparato de Golgi, que muestran una distribución alterada de estos orgánulos secretorios en las células infectadas, donde se localizan como estructuras anulares en el extremo externo de la zona de ensamblaje viral (Homman-Loudiyi et al., 2003, Seo et al., 2006, Sanchez et al., 2000a, Das et al., 2007).

Sin embargo, el origen de las membranas donde el CMVH obtiene su envoltura final es incierto. Para los herpes-virus de la sub-familia α como el virus herpes-simplex (VHS) y el virus de la pseudo-rabia (VPR) se ha propuesto que adquieren la envoltura de las membranas de vesículas derivadas del aparato de Golgi o red de vesículas del *trans*-Golgi ("*trans*-Golgi-network", TGN), (Mettenleiter et al., 2009). Al igual que para los α herpes-virus, también se ha propuesto para el CMVH que se envuelve en membranas del TGN (Sanchez et al., 2000a, Homman-Loudiyi et al., 2003), aunque estos estudios muestran solamente



una co-localización parcial del lugar de ensamblaje del CMVH con marcadores del TGN. En aparente contradicción, otros estudios han mostrado que las membranas donde se ensambla el CMVH forman parte de la ruta endocítica (Tooze *et al.*, 1993, Radsak *et al.*, 1996, Fraile-Ramos *et al.*, 2007, Fraile-Ramos *et al.*, 2002, Seo *et al.*, 2006, Das *et al.*, 2007, Krzyzaniak *et al.*, 2009). En estos trabajos se hicieron estudios de internalización de la glicoproteína viral gB (Radsak *et al.*, 1996) o de la peroxidasa de rábano (“*Horseradish Peroxidase*”, HRP) (Tooze *et al.*, 1993) y se examinó la localización del marcador de los MVBs/lisosomas CD63 (Fraile-Ramos *et al.*, 2002, Fraile-Ramos *et al.*, 2007) en las células infectadas por el CMVH, y tanto la gB como la HRP y el marcador CD63, se encontraron incorporados en la envoltura viral. Además, el marcador del antígeno-I de endosomas tempranos, (“*early endosome antigen-I*”, EEA1) y el marcador de endosomas de reciclaje, receptor de la transferrina (“*transferrin receptor*”, TfR) (Krzyzaniak *et al.*, 2009), se han encontrado co-localizando con el lugar de ensamblaje viral. También se ha descrito recientemente que el CMVH utiliza múltiples rutas paralelas de tráfico celular para hacer llegar hasta el área de ensamblaje proteínas virales necesarias para la morfogénesis de las nuevas partículas virales (Moorman *et al.*, 2010), convergiendo estas rutas celulares en el lugar de ensamblaje a tiempos tardíos de la infección.

Es posible que algunas de las discrepancias que existen se deban a los diferentes tipos celulares y a los distintos reactivos utilizados en todos esos estudios, además de a las profundas modificaciones que el CMVH induce en la célula infectada. Para intentar encontrar una respuesta a estas cuestiones, en este trabajo de tesis doctoral nos aproximamos al problema de la naturaleza de las membranas donde obtiene su envoltura final el CMVH mediante el uso de marcadores celulares bien caracterizados, que cubren toda la ruta exocítica, la ruta endocítica, y la ruta de transporte entre el TGN y los endosomas, y mediante la aplicación de distintas metodologías tanto morfológicas como bioquímicas.

1.3.2. Interacción del CMVH con los sistemas de membranas celulares.

Se ha descrito que existen ciertas proteínas virales que son capaces de interactuar directamente con componentes celulares relacionados con el tráfico de membranas, como son las proteínas del tegumento pp28 y pp150, que resultan esenciales en el proceso de maduración del virus. La proteína pp28 participa directamente en el envoltimiento viral y su localización en el área de ensamblaje es crítica para la producción de partículas virales maduras (Silva *et al.*, 2003, Britt *et al.*, 2004), es más, virus mutantes que no expresan la pp28 muestran la acumulación de cápsidas sin envoltura en el citoplasma (Silva *et al.*, 2003). La fosfoproteína pp150 se asocia con la núcleo-cápsida y participa en el envoltimiento de los viriones (AuCoin *et al.*, 2006). Además, existen datos que apuntan a que también las glicoproteínas de la envoltura viral gM y gN podrían contribuir al proceso de maduración de las partículas virales (Krzyzaniak *et al.*, 2007); es más, se ha descrito que la glicoproteína M es capaz de interactuar con componentes celulares relacionados con el tráfico de proteínas en el compartimento de reciclaje endosomal como es FIP4, un efector de la pequeña GTPasa Rab11 (Krzyzaniak *et al.*, 2009).

Aunque se conocen algunas de las proteínas virales que organizan y son esenciales para la adquisición de la envoltura final, el número de componentes celulares identificados que participan en este proceso es muy limitado. Así, se ha demostrado que ciertos factores celulares implicados en el transporte mediado por vesículas como son la proteína de la ruta exocítica Bicaudal D1, la pequeña GTPasa Rab11, uno de sus efectores FIP4, la pequeña GTPasa Rab27a, y la chaperona del retículo endoplásmico BiP, son necesarios para el transporte de proteínas virales al lugar de ensamblaje y para la producción de partículas virales infecciosas (Buchkovich *et al.*, 2009, Krzyzaniak *et al.*, 2009, Indran *et al.*, 2010, Fraile-Ramos *et al.*, 2010).



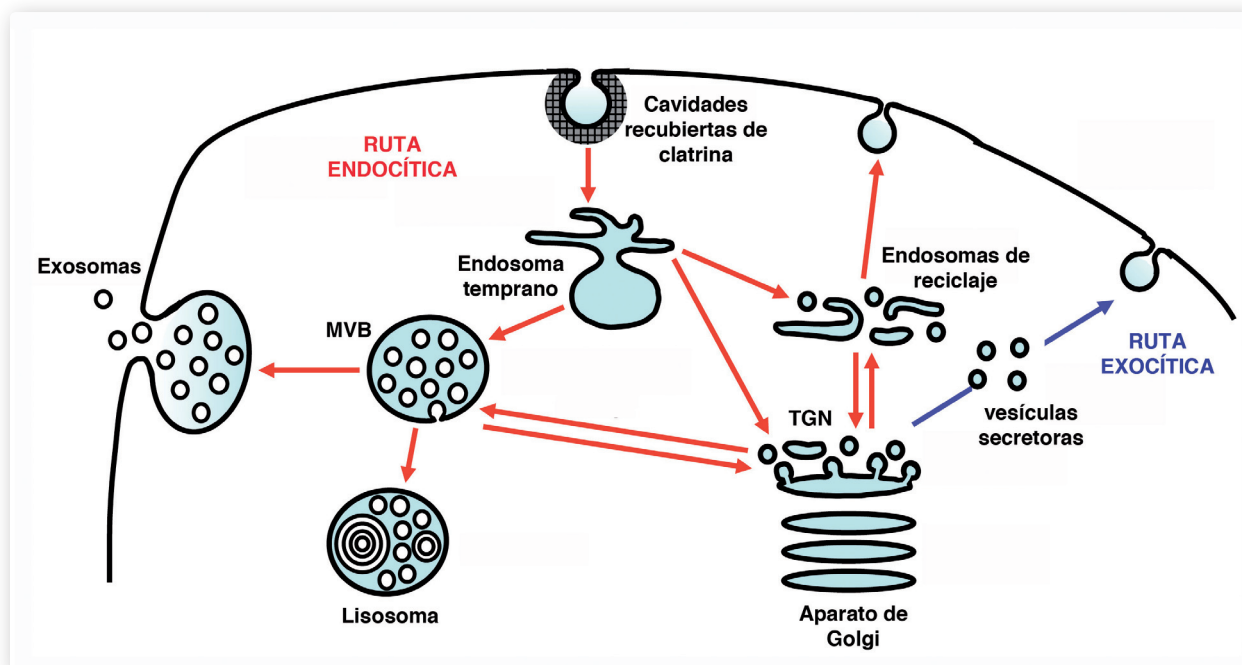
Por otro lado, está aún por determinar si el complejo celular endosomal de clasificación necesario para el transporte (“the cellular endosomal sorting complex required for transport”, ESCRT) participa o no en el envolvimiento del CMVH (Fraile-Ramos *et al.*, 2007, Tandon *et al.*, 2009).

Los recientes estudios de la expresión de genes celulares durante la infección por el CMVH han aportado datos muy relevantes sobre la interacción del virus con la célula hospedadora (Paul Kellam y Vincent Emery comunicación personal, Zhu *et al.*, 1998, Browne *et al.*, 2001, Hertel *et al.*, 2004, Stanton *et al.*, 2007). En relación al envolvimiento viral y la interacción del CMVH con las membranas celulares, se ha observado que el virus aumenta la expresión de un cierto número de genes que codifican para proteínas relacionadas con el transporte mediado por vesículas como son las proteínas SNARE, las pequeñas GTPasas Rab y sus efectores. Es muy probable que el virus, ya que interacciona necesariamente con las membranas celulares, utilice y manipule estos componentes celulares para producir nuevos viriones en las células infectadas.

2 Los sistemas de membranas celulares y el tráfico intracelular

2.1 La ruta exocítica.

La célula eucariota se comunica con su entorno a través de un elaborado sistema de membranas intracelular. De esta forma, incorpora partículas y macromoléculas presentes en el medio extracelular mediante una ruta de transporte intracelular conocida como ruta endocítica y las procesa hasta el nivel de metabolitos, o bien, libera al medio extracelular los carbohidratos y las proteínas recién sintetizadas en la célula a través de una ruta llamada biosintética-secretora o exocítica. Esta comunicación se lleva a cabo mediante un gran número de vesículas y tubos membranosos que viajan constantemente entre los distintos compartimentos celulares y entre éstos y la membrana plasmática. Ambas rutas de comunicación celular se encuentran interrelacionadas y reguladas minuciosamente. La ruta endocítica parte de la membrana plasmática hasta el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico (RE) mediante los endosomas y los lisosomas, existiendo una ruta alternativa de reciclaje de moléculas a través de los endosomas de reciclaje que termina de nuevo en la membrana plasmática, mientras que la ruta exocítica parte del RE hacia el aparato de Golgi y de éste continúa hasta la membrana plasmática, con una ruta alternativa desde el Golgi hasta los lisosomas (**Fig. 3**).



Adaptado de Pelchen-Matthews. Trends. Microbiol. 2004

Figura 3

Modelo de los sistemas de membranas celulares. Los distintos compartimentos están en constante comunicación a través de vesículas. Mediante la ruta exocítica se liberan al medio extracelular carbohidratos y proteínas sintetizados en la célula y mediante la ruta endocítica ésta incorpora macromoléculas presentes en el medio extracelular. TGN: red del trans-Golgi, "trans-Golgi-network", MVB: cuerpo multivesicular ("multivesicular body").



Las proteínas sintetizadas *de novo* en los ribosomas de la célula deben transportarse desde el citosol hasta su destino final, ya sea un orgánulo o el medio extracelular. Para ello, la primera etapa de su transporte consiste en su paso a través de la membrana del RE, donde se pliegan y adquieren su conformación definitiva, hasta la superficie celular a través del aparato de Golgi. Esta ruta se conoce como la ruta “por defecto” ya que las proteínas no necesitan señales específicas para transportarse a través de ella; en cambio, las proteínas marcadas según su futuro destino serán transportadas desde el aparato de Golgi hasta los endosomas, los lisosomas o las vesículas de secreción (Alberts *et al.*, 2008).

El aparato de Golgi se dispone en la zona perinuclear y presenta una estructura característica en forma de sáculos apilados. En este orgánulo se distinguen claramente dos caras, la cara de entrada de proteínas y lípidos desde el RE o cara *cis*, y la cara de salida de éstas hacia su destino, o cara *trans*; ambas caras son estructural y funcionalmente diferentes y se encuentran conectadas a compartimentos especializados compuestos por una red de vesículas; éstos son el compartimento intermediario o red del *cis*-Golgi y la red del *trans*-Golgi o (“*trans*-Golgi-network”, TGN) (Boulaflois *et al.*, 2008). Las moléculas que entran por el *cis*-Golgi desde el RE pueden volver a éste mediante lo que se conoce como transporte retrógrado desde el Golgi al RE, o bien atravesar los sáculos del orgánulo y salir de éste a través de la red de vesículas del TGN hasta su destino, lo que se conoce como transporte anterógrado (De Matteis *et al.*, 2008).

Las proteínas destinadas a ser transportadas hasta los lisosomas, como son las enzimas lisosomales o hidrolasas, son transportadas por los receptores de la manosa-6-fosfato en vesículas desde la red del TGN hasta los MBVs, que madurarán posteriormente a lisosomas. Los lisosomas son orgánulos especializados en la degradación de diferentes componentes celulares o endocitados desde el espacio extracelular. Para ello, contienen enzimas hidrolíticas especializadas conocidas como hidrolasas que operan a pH ácido, razón por la cual el interior de los lisosomas se encuentra a un pH = 5 que se mantiene gracias a bombas de protones especializadas que se localizan en la membrana lisosomal. Las hidrolasas lisosomales llevan señales específicas de transporte hasta los lisosomas que consisten en la presencia de oligosacáridos cuyos residuos de manosa han sido fosforilados. Estos grupos manosa-6-fosfato son reconocidos por unos receptores específicos en el TGN, los receptores de la manosa-6-fosfato dependiente de cationes o independiente de cationes (“cation dependent or cation independent mannose-6-phosphate receptor”, CD-M6PR o CI-M6PR), que clasifican y ayudan a empaquetar las hidrolasas en vesículas que viajan desde el TGN hasta los endosomas tardíos y viceversa. Las hidrolasas lisosomales se disocian del receptor M6PR cuando se encuentran en el ambiente a pH ácido de los endosomas tardíos y vuelven al TGN (Rohn *et al.*, 2000).

2.2 La ruta endocítica.

El proceso mediante el cual las macromoléculas, partículas e incluso en el caso de las células fagocíticas, otras células, son incorporadas desde el medio extracelular hasta el interior de la célula mediante vesículas intracelulares se conoce como endocitosis (van Meel *et al.*, 2008). El primer paso en los procesos de endocitosis consiste en la formación de una invaginación en la membrana plasmática que rodea a los componentes que van a ser endocitados, que posteriormente se escinde dando lugar a una vesícula intracelular que contiene estos componentes. La formación de la vesícula puede ser dependiente de la proteína denominada clatrina o independiente de ésta. Entonces, la vesícula viaja hasta los endosomas, donde su membrana se fusiona con la de éstos liberando su cargo. Los componentes de la membrana plasmática incorporados en las vesículas que son devueltos a la propia membrana viajan mediante vesículas





Introducción

a través de los denominados endosomas de reciclaje. Los endosomas aparecen al microscopio electrónico como un conjunto complejo de vesículas y estructuras membranosas de aspecto tubular que se localizan desde la zona perinuclear hasta los confines de la célula. La tinción con marcadores específicos revela que existen varios tipos de endosomas, los endosomas tempranos, que se encuentran directamente bajo la membrana plasmática y los endosomas tardíos, que se localizan cerca del aparato de Golgi.

Los endosomas tempranos provienen de la fusión de vacuolas de endocitosis, se encuentran en constante comunicación con diferentes orgánulos y actúan como una estación de recepción de clasificación y de reparto de los componentes endocitados y del contenido de las vesículas que proceden del TGN del aparato de Golgi; en este punto convergen la vía endocítica y la vía exocítica. Se ha propuesto que los endosomas tempranos poseen varios dominios estructurales y funcionales en su membrana en donde se fusionan las vesículas de endocitosis procedentes de la membrana plasmática, se reciclan algunos componentes hacia la membrana plasmática, parten las vesículas que viajan en la ruta de los endosomas al TGN o parten los complejos membranosos que forman los endosomas tardíos.

A los endosomas tardíos también se los denomina cuerpos multivesiculares ("*multi vesicular bodies*", MBVs) porque cuando se examinan bajo el microscopio electrónico su apariencia es la de vacuolas que contienen una gran cantidad de pequeñas vesículas en su interior donde se alojan las macromoléculas que serán degradadas en los lisosomas o bien serán liberadas al medio extracelular, dependiendo del tipo celular. El paso de endosomas tempranos hasta lisosomas no está aún del todo claro (Luzio *et al.*, 2007); generalmente se acepta que los MBVs se generan a partir de los endosomas tempranos mediante la formación de pequeñas invaginaciones en su membrana limitante que por estrangulación darán lugar a las vesículas internas de los MBVs (Razi *et al.*, 2006). Éstos maduran progresivamente hasta convertirse en lisosomas mediante la incorporación de las hidrolasas procedentes del TGN que van acidificando el lumen del orgánulo y de membranas que van formando las lamelas características de los lisosomas, o bien mediante la fusión de los MBVs con lisosomas previamente existentes en el citoplasma. En los MBVs se lleva a cabo un último paso de reciclaje de macromoléculas mediante vesículas que viajan de vuelta hacia los endosomas tempranos o hacia el TGN, o bien las macromoléculas viajan a los lisosomas.

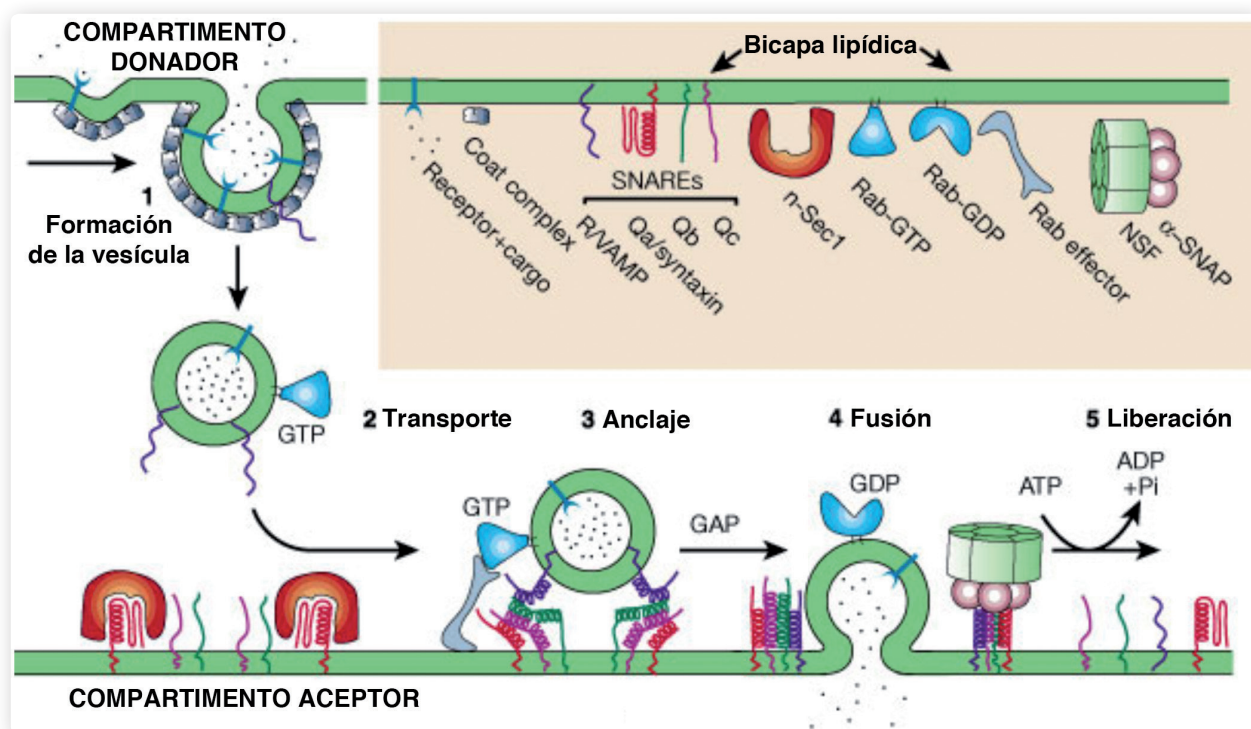
Por otro lado, en las células secretoras, los MBVs liberan las vesículas que contienen al espacio extracelular mediante su fusión con la membrana plasmática en vez de madurar hasta convertirse en lisosomas. A estas vesículas de secreción se les denomina exosomas y su contenido es variable según el tipo celular; por ejemplo, las células dendríticas y las células B del sistema inmune liberan exosomas que cumplen funciones en la respuesta inmune adaptativa a patógenos y a células tumorales (Savina *et al.*, 2005, Blott *et al.*, 2002).



2.3 Transporte mediado por vesículas.

La comunicación entre los diferentes compartimento celulares y entre éstos y la membrana plasmática se realiza mediante el tráfico constante de vesículas y tubos. Así, las vesículas se generan en la membrana del orgánulo donador mediante un proceso de gemación y viajan hasta su destino, donde se fusionan con la membrana del orgánulo aceptor (**Fig. 4**).

Las pequeñas GTPasas Rab que están insertas en la membrana de la vesícula determinan el destino de ésta. Al igual que otras GTPasas, las proteínas Rab pueden adoptar 2 conformaciones, una inactiva unida a GDP (guanosina bifosfato) que se adopta cuando la vesícula está asociada a una membrana, y una activa unida a GTP (guanosina trifosfato) que se adopta cuando la vesícula se encuentra libre en el citoplasma. Cuando la vesícula llega a su compartimento aceptor, ambas membranas se fusionan y el contenido de la vesícula se libera al interior del compartimento (**Fig. 4**). Para que esto pueda ocurrir, la vesícula debe anclarse a la membrana aceptor y iniciar el proceso de fusión; las proteínas Rab juegan un papel fundamental en el anclaje mientras que la familia de proteínas SNAREs lleva a cabo físicamente el proceso de fusión de las membranas (Jordens *et al.*, 2005, Jahn *et al.*, 2006, Martens *et al.*, 2008).



Tomado de Bock et al, Nature 2001

Figura 4

Modelo del transporte mediado por vesículas. La vesícula se forma en el compartimento donador mediante gemación y viaja hasta su compartimento destino donde ambas membranas se fusionan y el contenido de la vesícula se libera. El proceso de fusión está catalizado por las proteínas SNAREs, que aproximan ambas membranas para que se inicie la fusión.

2.3.1 El ciclo de fusión de membranas y la familia de proteínas SNAREs.

Como se ha expuesto previamente, los procesos de fusión de membranas están dirigidos por una familia de proteínas llamadas SNAREs, donde las siglas provienen de receptores de SNAP (“SNAP Receptors”) y SNAP significa proteína de anclaje al NSF soluble (“Soluble NSF-Anchorage Protein”), siendo NSF el factor sensible a la N-etil-maleimida (“N-ethylmaleimide sensitive factor”) (Jahn et al., 2006).

En la membrana de las vesículas de transporte se encuentran SNAREs específicas que se unen de forma complementaria a las SNAREs presentes en la membrana aceptora cuando la vesícula llega a su destino, formando un complejo muy estable conocido como complejo de fusión o complejo SNARE. Las proteínas SNAREs presentes en la vesícula se conocen como sinaptobrevinas o proteínas de membrana asociadas a la vesícula, (“Vesicle Associated Membrane Proteins”, VAMPs); mientras que en la membrana aceptora se localizan las SNAREs tipo sintaxinas, y las SNAREs conocidas como las proteínas solubles de anclaje del factor sensible a la N-etil-maleimida (NSF), (“Soluble NSF Attachment Proteins”, SNAPs).

Las SNAREs son una familia de proteínas integrales de membrana que tienen una α -hélice característica compuesta por 60 aminoácidos llamada motivo SNARE. A través de este motivo se unen a las otras proteínas SNAREs de forma específica y constituyen el complejo de fusión (Lang et al., 2002). En la terminología original de las proteínas SNARE, éstas se clasificaron como v-SNAREs o SNAREs presentes en la membrana de la vesícula (VAMPs) y t-SNAREs o “target SNAREs”, presentes en la membrana aceptora (SNAPs y sintaxinas). Sin embargo, cuando se resolvió la estructura del complejo de fusión mediante estudios de cristalografía de rayos X (Sutton et al., 1998), esta clasificación fue revisada y las SNAREs se reclasificaron en función de la presencia de aminoácidos esenciales para la fusión en la región central del complejo SNARE. De acuerdo a esta nueva clasificación, se denominaron R-SNAREs a aquellas que poseen una arginina (R) esencial en el centro del complejo de fusión, y Q-SNAREs a las que poseen 3 glutaminas (Q) claves en el centro del complejo (Fasshauer et al., 1998). Esta nueva clasificación resulta más lógica que la antigua ya que existen casos, como ocurre en la fusión homotípica, donde se fusionan vesículas de la misma naturaleza. Los estudios de cristalografía de rayos X revelaron que el complejo SNARE está formado por cuatro α -hélices que se disponen de forma paralela (Sutton et al., 1998) (Fig. 5).

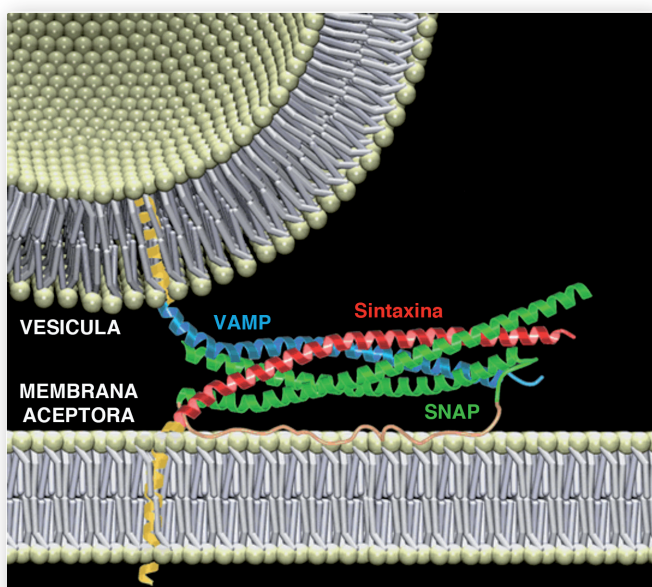


Figura 5

Modelo de la estructura del complejo SNARE. El complejo SNARE permite la aproximación de las membranas de la vesícula y la del orgánulo aceptor, lo que inicia el proceso de fusión

Tomado del grupo de investigación del Dr. Fasshauer



Generalmente, tres hélices de las cuatro que forman el complejo, provienen de las Q-SNAREs (la syntaxina, que proporciona una hélice y la SNAP, que proporciona dos) y una hélice proviene de una R-SNARE (VAMP). La formación del complejo SNARE es esencial en el proceso de fusión de membranas, pues hace posible el acercamiento de las dos membranas (Jahn *et al.*, 2006). Existen además otras proteínas claves en este proceso, que también regulan el transporte de vesículas y deciden la especificidad de la unión entre las membranas; son las proteínas Rab, las proteínas Sec/Munc y el factor sensible a la N-etil-maleimida (“NEM-Sensitive Factor”, NSF) y sus cofactores (α -SNAP y β -SNAP) (Jahn *et al.*, 2003). Tras la fusión, el NSF disocia el complejo, las SNAREs se liberan y vuelven a estar preparadas para un nuevo ciclo de fusión (**Fig. 4**).

Cada tejido posee una colección diferente de SNAREs que se localizan en distintos compartimentos celulares. Las SNAREs mejor caracterizadas son las de las neuronas, donde se vio que en los procesos de liberación de las vesículas sinápticas el complejo de fusión está formado por la syntaxina 1, la SNAP 25 y la sinaptobrevina 2 (McMahon *et al.*, 1995). En otros tipos celulares se han identificado otras SNAREs cuya localización y función aún no se conoce bien, como son la syntaxina 2, 3 y 4, SNAP 23, 29, 47 y diversas proteínas VAMP (Ibaraki *et al.*, 1995, Ravichandran *et al.*, 1996, Steegmaier *et al.*, 1998).

2.3.2 Las sub-familia de las syntaxinas. La syntaxina 3.

La sub-familia de las syntaxinas está compuesta hasta la fecha por 14 proteínas de unos 290 aminoácidos. La mayoría de las syntaxinas comparten una estructura común que consiste en una región amino-terminal sin plegar seguida por un dominio triple regulador “Habc”, el dominio SNARE y una región trans-membrana en el extremo carboxi-terminal necesaria para la unión de la proteína a la membrana (Fernandez *et al.*, 1998, Misura *et al.*, 2000).

Las syntaxinas se identificaron por primera vez en diferentes células del sistema nervioso, donde se localizan en la membrana plasmática. La syntaxina 1 se expresa abundantemente en la terminal pre-sináptica de las neuronas, donde participa en el proceso de fusión de las membranas de las vesículas pre-sinápticas con la membrana plasmática durante la transmisión del impulso nervioso (Bennett *et al.*, 1992, Foletti *et al.*, 2000). La distribución por tejidos de las syntaxinas se determinó mediante análisis por Northern blot; la syntaxina 1 se encontró exclusivamente en el sistema nervioso mientras que los tejidos no-neuronales expresan diferentes conjuntos de syntaxinas que se localizan en distintos orgánulos. Su localización en distintos compartimentos indica que las diferentes syntaxinas participan en distintas rutas especializadas de transporte en la célula (Bennett *et al.*, 1993, Watson *et al.*, 2001).

La syntaxina 3 (STX3) se expresa en los siguientes órganos: corazón, pulmón, riñón y bazo (Bennett *et al.*, 1993), en páncreas, intestino y en las glándulas salivares (Gaisano *et al.*, 1996, Breuza *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2002, Castle *et al.*, 2002) así como en células del sistema inmune, como los neutrófilos y los mastocitos (Martin-Martin *et al.*, 1999, Paumet *et al.*, 2000, Hibi *et al.*, 2000, Stow *et al.*, 2006). La STX3 se clasifica como una Q-SNARE y comparte estructura general y dominios proteicos con las demás syntaxinas de la familia (Sutton *et al.*, 1998, Fernandez *et al.*, 1998, Misura *et al.*, 2000, Sharma *et al.*, 2006).

En las células humanas se han identificado y descrito dos isoformas de la syntaxina 3, conocidas como STX3A y STX3B (Martin-Martin *et al.*, 1999, Band *et al.*, 2005). La secuencia completa de la STX3A





Introducción

comprende 870 nucleótidos que codifican para una proteína compuesta por 289 aminoácidos con un peso molecular de alrededor de 33.2 kiloDalton (kDa). La STX3B es idéntica a la anterior, pero carece de 37 residuos amino-ácidos en el extremo carboxi-terminal. A nivel estructural, se han detectado varios sitios en la STX3A que muestran cierta homología con sitios para modificaciones post-traduccionales como son un sitio potencial de fosforilación para la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (AMPc) y dos sitios potenciales de amino-miristilación en los residuos glicina 180 y 283, que también se encuentran en la STX3B (Martin-Martin *et al.*, 1999). Esta información estructural sugiere la posibilidad de que pudiera existir una regulación adicional de la función de la STX3 a nivel de estas modificaciones post-traduccionales.

La STX3 se localizó por primera vez mediante la expresión de una construcción que contenía el ADN complementario (ADNc) de esta syntaxina fusionado a un epítipo de la hemaglutinina de la gripe humana ("human influenza hemagglutinin", HA) en su extremo N-terminal, y resultó encontrarse en la membrana plasmática celular (Bennett *et al.*, 1993). Sin embargo, más adelante, cuando se estudió la localización de la STX3 endógena se encontró que se expresaba, además de en la membrana plasmática, en compartimentos intracelulares como son el TGN, el compartimento túbulo-vesicular de las células gástricas parietales o los gránulos citoplásmicos de las células acinares del páncreas (Band *et al.*, 2005, Lapierre *et al.*, 2007, Hansen *et al.*, 1999). La localización intracelular de la STX3 en determinados tipos celulares indica que la proteína puede participar también en eventos de fusión en compartimentos intracelulares además de en la fusión de vesículas con la membrana plasmática.

En las células epiteliales polarizadas, la STX3 se localiza en la membrana apical y participa en el transporte de vesículas exocíticas desde el TGN hasta esta membrana (Low *et al.*, 1996). Es más, el transporte de la STX3 a la membrana apical es esencial para que se lleve a cabo el proceso de polarización en este tipo celular (Sharma *et al.*, 2006). Para otros tipos celulares se ha descrito que la STX3 participa en eventos de expansión de membranas como son el crecimiento de las neuritas y la elongación de los procesos neuronales mediados por la exocitosis de las membranas intracelulares en las células neuroendocrinas (Darios *et al.*, 2006); la fusión del compartimento túbulo-vesicular con la membrana plasmática apical en respuesta al estímulo correspondiente en las células gástricas parietales (Ammar *et al.*, 2002, Lapierre *et al.*, 2007) y la biogénesis y la renovación constante de las membranas del segmento externo de los bastones en las células fotorreceptoras de la retina (Kwok *et al.*, 2008). Además de las funciones ya descritas, la STX3 participa en eventos de fusión homotípica como es la fusión gránulo-gránulo en las células zimogénicas acinares del páncreas (Hansen *et al.*, 1999).





objetivos







La adquisición de la envoltura es un paso clave en la producción de partículas virales infectivas. Por esta razón, caracterizar la interacción del citomegalovirus humano con los sistemas de membranas celulares es esencial para comprender la biología de la replicación de éste y de otros herpes-virus. Esta información contribuirá a entender mejor la patogénesis de las enfermedades causadas por estos importantes agentes infecciosos y permitirá la identificación de proteínas diana para el desarrollo de nuevas estrategias antivirales. Además, estos estudios ayudarán a comprender mejor cómo ocurren y cómo se regulan en la célula los procesos de tráfico de membranas.

En este sentido, establecimos dos objetivos principales:

1. Identificar la naturaleza de los compartimentos celulares donde el citomegalovirus humano adquiere su envoltura final.
2. Analizar la implicación de la proteína SNARE syntaxina 3 en las etapas finales del envolvimiento y la liberación viral.





materiales y métodos





I Reactivos y anticuerpos

Los reactivos químicos necesarios para llevar a cabo estos estudios proceden de Sigma Aldrich (Madrid, España) siempre que no se indique lo contrario, mientras que el material plástico y los reactivos empleados para el cultivo de las células utilizadas en estos ensayos proceden de LabClinics S.A. (Barcelona, España).

Los anticuerpos usados contra proteínas celulares en los estudios descritos a continuación provienen de las siguientes fuentes: el anticuerpo anti-anexina I (Isacke *et al.*, 1989) de la Dra. Claire Isacke (CRUK, Londres, Reino Unido); el anti-HRS (Komada and Kitamura, 1995) de la Dra. Sylvie Urbé (Universidad de Liverpool, Liverpool, Reino Unido); el anti-CD-M6PR y el anti-CI-M6PR (Klumperman *et al.*, 1993) del Dr. Kurt von Figura (Universidad de Göttingen, Göttingen, Alemania); el anti-CD-M6PR 22d4 (Messner, 1993), desarrollado por el Dr. Donald Messner, y los anti-Lamp1 y Lamp2, H4A3 y H4B4 (Chen *et al.*, 1985), desarrollados por el Dr. Thomas August se obtuvieron del Banco de Híbridos de Estudios de Desarrollo ("Developmental Studies Hybridoma Bank", Universidad de Iowa, IA, EEUU); el anti-CD63 IB5 (Fraile-Ramos *et al.*, 2001) del Dr. Mark Marsh (MRC, LMCB, Londres, Reino Unido); el anti-CD63 TEA3/18 (Yanez-Mo *et al.*, 1998) del Dr. Francisco Sánchez-Madrid (Servicio de Inmunología del Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España); anti-Lamp1 y anti-Lamp2 (Dahlgren *et al.*, 1995) del Dr. Sven Carlsson (Universidad de Umeå, Suecia); el suero anti-EEA1 y el anti-cadena pesada de la clatrina ("clathrin heavy chain", CHC) clon 23 son comerciales y proceden de BD Biosciences (San Jose, California, USA); el anti-TGN46 fue adquirido de Serotec (Oxford, Reino Unido); los anti-actina y el anti- β -actina AC-15 se adquirieron de Sigma Aldrich (Madrid, España); el anti-STX3 procede de Synaptic Systems, (SYSY, Göttingen, Alemania) y el anti-c-myc 9B11 es de Cell Signalling (Massachusetts, EEUU). Los anticuerpos contra proteínas del CMVH utilizados en este estudio son los siguientes: el anti-UL33 (Margulies *et al.*, 1996) del Dr. Wade Gibson (Escuela Universitaria de Medicina Johns Hopkins, Baltimore, MA, EEUU); el anti-pp28 (Silva *et al.*, 2003) del Dr. Thomas Shenk (Universidad de Princeton, Princeton, NJ, EEUU); los anti-gH (Cranage *et al.*, 1988) y anti-gB (Cranage *et al.*, 1986) de la Dra. Helena Browne (Universidad de Cambridge, Cambridge, Reino Unido); Los sueros positivo y negativo para el CMVH de donantes anónimos sanos proceden del Centro de Transfusiones de Sangre de la Comunidad de Madrid y fueron cedidos por el Dr. Hugh Reyburn (Centro Nacional de Biotecnología, CNB, Madrid, España); el anti-pp65 procede de Chemicon International (Temecula, CA, EEUU). Los anticuerpos utilizados contra glicoproteínas del virus herpes simplex son: el anti-gD (Minson *et al.*, 1986) y anti-gG (Richman *et al.*, 1986) del virus herpes simplex tipo 1 (VHS-1) de la Dra. Helena Browne (Universidad de Cambridge, Cambridge, Reino Unido) y los anti-gB y anti-gD del virus herpes simplex tipo 2 (VHS-2) (Domingo *et al.*, 2003) del Dr. Enrique Tabarés (Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España). Los anticuerpos secundarios empleados en estos estudios, bien acoplados a marcadores fluorescentes, o bien conjugados con la peroxidasa de rábano ("Horseradish peroxidase", HRP) u oro, fueron adquiridos de Invitrogen S.A. (Barcelona, España), Thermo Scientific (supplied by Cultek S.L., Madrid, Spain) y BioCell International (Cardiff, Reino Unido), respectivamente.





2 Células y virus

Los fibroblastos de prepucio humano inmortalizados, células BJ1, fueron adquiridos de Clontech (California, USA) y cultivados en una mezcla 4:1 de medio modificado de Dulbecco ("*Dulbecco's modified Eagle's medium*", DMEM) y medio 199, suplementada con suero fetal de ternera ("*fetal calf serum*", FCS) al 10%, piruvato sódico a concentración 1 mM, glutamina-L a 4 mM, penicilina a 100 U mL⁻¹ y estreptomicina a 0.1 mg mL⁻¹. Las células MeWo derivadas de melanoma humano fueron cedidas por el Dr. Lluís Montoliu (CNB, Madrid, España) y mantenidas en medio DMEM suplementado con FCS al 10%, glutamina-L a 2 mM, penicilina a 100 U mL⁻¹ y estreptomicina a 0.1 mg mL⁻¹. Estas células fueron transducidas con vectores lentivirales que expresan RNAs de interferencia ahorquillados cortos ("*short hairpin RNAs*", shRNAs) contra la proteína STX3 en los experimentos descritos más adelante. Las células BJ1 y MeWo eficientemente transducidas fueron seleccionadas en medio que contiene 2 y 10 µg/mL de puomicina respectivamente, y posteriormente, los niveles de expresión de la STX3 fueron analizados mediante Western Blot (WB). Por otro lado, las células BJ1 fueron transducidas con lentivirus que expresan una construcción sin inserto o bien una construcción que contiene el inserto STX3-c-myc, que es resistente a la inhibición de la expresión de la STX3 producida por los shRNAs. Estas células BJ1 resistentes a la acción de los shRNAs anti-STX3 fueron marcadas y se seleccionaron y recolectaron utilizando un citómetro de flujo ALTRA HyPerSort (Beckman Coulter, Inc., Palo Alto, EEUU). Las células del epitelio de riñón del mono verde africano, células Vero, fueron donadas por la Dra. Cristina Risco (CNB, Madrid, España).

La cepa "Towne" del CMVH y una variante recombinante de la cepa AD169 del CMVH, RecCMV, que expresa la proteína fluorescente verde ("*Green Fluorescent Protein*", GFP) bajo el control del promotor temprano β 2.7 del CMVH, que se expresa desde las 8 horas tras la infección (McSharry et al., 2001), se propagaron en células BJ1 y se titularon mediante la detección por inmunofluorescencia (IF) de la proteína viral pp65 y mediante la visualización de la expresión de la GFP, respectivamente. El herpes-virus VHS-1 se propagó en células Vero y fue titulado mediante el marcaje con una mezcla de los anticuerpos anti-gB y anti-gD del VHS-2, que reaccionan de modo cruzado con sus proteínas homólogas en VHS-1, y su posterior detección mediante inmuno-tinción.

Los vectores lentivirales necesarios para el silenciamiento génico mediante shRNAs, fueron generados en células HEK-293T mediante la transfección conjunta de tres plásmidos de expresión: (1) p8.91, un plásmido que contiene los genes estructurales "Gag-Pol" del retrovirus de la inmunodeficiencia humana ("*human immunodeficiency virus*", HIV), que son necesarios para que se ensamblen las partículas lentivirales; (2) pMDG, un plásmido que expresa la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular y cuya función consiste en proveer a los lentivirus de una envoltura diferente a la del retrovirus en que se basan los vectores lentivirales para que puedan infectar otras células diferentes de las que infecta el HIV, este proceso de cambio de envoltura se conoce como pseudotipaje; (3) los plásmidos de expresión retroviral que contienen el shRNA control que no silencia ninguna proteína SHC002 o los shRNAs contra la STX3, TRCN0000065013, TRCN0000065014, TRCN0000065015 y TRCN0000065016 (librería de shRNAs TCR Mission®, Sigma Aldrich) (Moffat et al., 2006) tal y como se ha descrito (Naldini et al., 1996).

La construcción STX3-c-myc resistente a los shRNAs (GenScript, New Jersey, EEUU) fue transferida mediante la secuencia de recombinaciones Gateway® vía el plásmido pDONR201 (Invitrogen) al plásmido





de expresión lentiviral pLNT-SFFV-WPRE obtenido a través del Dr. Peter van der Sluijs del Dr. Adrian Thrasher, (University College London, Londres, Reino Unido). Los lentivirus recombinantes fueron preparados como se ha descrito anteriormente.

Las partículas virales del CMVH presentes en los sobrenadantes de las células infectadas fueron purificadas mediante gradientes de glicerol-tartrato, como se describió previamente (Talbot and Almeida, 1977; Irmieri and Gibson, 1983; Blankenship and Shenk, 2002). Las células BJI se infectaron con la cepa Towne del CMVH a una multiplicidad de infección (MDI) de tres partículas infecciosas por célula. Cuando aproximadamente el cincuenta por ciento de las células se encontraban despegadas de la placa de cultivo, generalmente a día 6 post-infección, se recogió el sobrenadante y se retiraron los restos celulares mediante centrifugación a 1.200 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante clarificado se depositó sobre un colchón de sorbitol (sorbitol-D al 20%, 50 mM Tris pH 7.4, 1 mM MgCl₂) y las partículas virales fueron recolectadas mediante centrifugación a 20.000 rpm durante 90 minutos a 4°C en una centrífuga con un rotor Beckman SW28. Las partículas virales se resuspendieron en un tampón con la siguiente composición: 50 mM Tris, pH 7.4, 100 mM NaCl e inhibidores de proteasas (Roche), se sonicaron, se depositaron sobre un gradiente de glicerol-tartrato y se centrifugaron a 40.000 rpm durante 15 minutos a 4°C en una centrífuga con un rotor Beckman SW41. Del gradiente de purificación se recuperaron 3 fracciones que se tiñeron negativamente con acetato de uranilo al 2% y se examinaron en el microscopio electrónico para determinar su composición. La fracción que contenía mayor número de viriones fue sometida a un paso adicional de purificación mediante un segundo gradiente de glicerol-tartrato. Las partículas extraídas de los gradientes se diluyeron 7 veces en un tampón cuya composición era 50 mM Tris, pH 7.4, 100 mM NaCl, y fueron recuperadas mediante centrifugación a 21.000 rpm durante 1 hora a 4°C en una centrífuga con un rotor Beckman SW41, y resuspendidas en el mismo tampón suplementado con los inhibidores de proteasas. La pureza de los virus recuperados se confirmó haciendo una tinción negativa con acetato de uranilo al 2% y examinando las partículas en el microscopio electrónico. La cantidad de proteína presente en el purificado viral se determinó mediante un ensayo de micro BCA (Thermo Scientific).

3 PCR cuantitativa a tiempo real

Para evaluar la expresión de los ARNs mensajeros (mRNAs) de los diferentes marcadores celulares, de la proteína STX3 y de la proteína del CMVH pp65, células BJI crecidas en placas de 60 mm se mantuvieron sin infectar o se infectaron con la cepa Towne del CMVH, a una multiplicidad de infección de 3 partículas infecciosas por célula. El ARN total se extrajo a día 0 para las células sin infectar, y a 1, 2, 3, 4 y 5 días post-infección para las células infectadas por el CMVH, utilizando el kit “RNeasy mini” (Quiagen, distribuido por Izasa S.A., Barcelona, España). Sobre el ARN extraído se llevó a cabo una digestión con DNAsa (Quiagen).

El análisis de la expresión génica relativa de las proteínas TGN46, EEA1, anexina I, TfR, CD63, CD-M6PR, CI-M6PR, STX3 y del gen del CMVH UL83 que codifica para la proteína pp65, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (“*polimerase chain reaction*”, PCR) a tiempo real (“*real time PCR*”, RT-PCR) de forma cuantitativa (“*quantitative RT-PCR*”, qRT-PCR) se llevó a cabo en el Servicio de Genómica del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” CSIC-UAM, Madrid. La posible contaminación con DNA se testó mediante la amplificación de muestras que no habían sido transcritas de manera reversa, ésta fue negativa o bien no cuantificable, incluso cuando se aplicó el análisis de expansión no intrónica (ver detalles de la transcripción reversa, RT,





más adelante). Los niveles de ARN se cuantificaron en un espectrofotómetro ND-1000 (Thermo Fisher Scientific); los valores del ratio 260/280 de absorbancia de las muestras estaban en torno a 2, y los niveles de ARN se situaron entre 2.1 y 3 mg/mL. La integridad del RNA analizado se midió en un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies) y se situó entre 8.80 y 10, lo que muestra una excelente integridad. Las reacciones RT se llevaron a cabo usando el kit “*High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix with No RT Control*” (Applied Biosystems S.A., Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cada gen celular, se diseñaron ensayos de extensión de intrones mediante el software “*Probe Finder*” (Roche Applied Science, <http://www. Roche-Applied-Science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=UP030000>) utilizando un par de primers común a todos los transcritos para un mismo gen. Este software se utilizó también para diseñar el análisis del gen viral UL83. Las reacciones de PCR cuantitativa se llevaron a cabo por triplicado en un volumen final de 10 mL, utilizando una cantidad de ADNc equivalente a 5 ng de ARN total, 250 nM de cada primer y 5 µL de la mezcla Master Mix de Power SYBR Green (Applied Biosystems) usando una reacción “*MicroAmp Optical 384-well reaction*” (Applied Biosystems) con un ABI 7900HT (Applied Biosystems). Las condiciones de reacción comprenden un paso inicial de desnaturalización del ADN durante 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de dos pasos (95°C durante 15 s y 60°C durante 60 s). Después de cada ciclo, se llevó a cabo una curva de disociación de 60°C a 95°C (de 2% de pendiente) para excluir la formación de dímeros de primers y otras amplificaciones no específicas. La eficiencia de amplificación de la PCR y el rango lineal dinámico se determinaron para cada ensayo. El análisis de datos fue realizado con el software SDS 2.2.1. (Applied Biosystems) y la normalización entre las muestras se llevó a cabo mediante la amplificación del 18S ARNr.

El número de genomas del CMVH presentes en los sobrenadantes de células infectadas, fue analizado mediante la misma técnica descrita en el párrafo anterior. Los duplicados experimentales de los sobrenadantes que contenían los virus se diluyeron 1:10 y se utilizaron 2 µL del diluido para su amplificación usando primers específicos para la glicoproteína viral gB descritos previamente (Fox et al., 1992): 5'-GAGGACAACGAA-ATCCTGTTGGGCA-3' (gB1) y 5'-TCGACGGTGGAGATACTGCTGAGG-3' (gB2). Se creó una curva estándar utilizando el ADN de la gB del CMVH clonada, el producto de 149 pb se detectó mediante el uso del reactivo SYBR Green® (Applied Biosystems, California, USA). El número de genomas virales se calculó utilizando el software perteneciente a la plataforma ABI 7900HT (Applied Biosystems).

4 Ensayos de inmunofluorescencia

Para analizar la distribución subcelular de los diferentes marcadores celulares y virales utilizados en este trabajo o para comparar la distribución y la expresión de marcadores celulares entre las células control y las células silenciadas para la STX3, las células BJ1 o MeWo crecidas sobre cubreobjetos de cristal se mantuvieron sin infectar o bien se infectaron por el CMVH con una MDI de 0,5 partículas virales por célula y se fijaron a los 5 días post-infección con una dilución de paraformaldehído (PFA) al 3% en búfer fosfato salino (“*phosphate-buffered saline*” PBS). Los grupos aldehídos libres se neutralizaron con NH₄Cl y las células se mantuvieron intactas o se permeabilizaron con 0,05% de saponina en PBS y se tiñeron con los anticuerpos apropiados en presencia de un 10% de suero humano para bloquear las glicoproteínas virales gp68 y gp34 (o receptores virales Fc), que tienen gran afinidad de unión por el dominio Fc de algunas inmunoglobulinas (Ig) entre ellas, las IgG de conejo y humanas (Atalay et al., 2002), y que podrían unir los anticuerpos primarios de conejo utilizados en estos estudios. A continuación, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios apropiados acoplados a fluoróforos, y los núcleos celulares se tiñeron con 5 mg/mL del reactivo fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Sigma Aldrich) en PBS. Tras la tinción,





los cubreobjetos se montaron con el reactivo ProLong Gold (Invitrogen) y las células fueron analizadas utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DMRXA equipado con una cámara CCDDC300F, o bien con un microscopio de fluorescencia confocal Leica DMI6000 equipado con un sistema de escáner láser multiespectral confocal Leica TCS-SP5. Durante el examen de las células en el microscopio confocal, se tomaron series de secciones ópticas a través de la altura de las células a intervalos de 0,4 μm . La cuantificación del coeficiente de solapamiento de Manders, R (donde $R = 0$ significa que no existe ningún solapamiento entre las proteínas y $R = 1$ significa que hay un solapamiento completo) (Manders *et al.*, 1993), se calculó mediante el software “*Suite Advanced Fluorescence*” (Leica Microsystems). Al menos 10 células diferentes fueron analizadas y se tomaron 3 secciones ópticas para las células sin infectar y un mínimo de 5 secciones para las células infectadas para calcular el coeficiente R de solapamiento. Para preparar las figuras, las imágenes digitales fueron transferidas a Adobe Photoshop y ajustadas de modo que la intensidad de valores se extienda a través del rango completo medible (0-255 niveles de gris).

Para analizar la expresión de CD63 en la superficie de las células MeWo control y silenciadas para la STX3, 2×10^5 células despegadas con EDTA a concentración 10 mM en PBS se tiñeron con un anticuerpo anti-CD63 TEA3/18 y un antisuero de ratón conjugado con ficoeritrina (“*phycoeritrin*”, PE). La expresión de CD63 fue cuantificada mediante la detección de la PE mediante citometría de flujo con un citómetro de flujo Epics XL-MCL (Beckman Coulter, Inc.). Como control del marcaje, se utilizaron células donde se omitió el anticuerpo primario.

5 Inmuno-marcaje de crio secciones y de virus aislados para ME.

Las células BJ1 parentales o bien las que expresan la construcción resistente a los shRNAs, STX3-c-myc, fueron infectadas con la cepa Towne del CMVH a una MDI de 3 partículas infecciosas por célula. A los 5 días tras la infección, los sobrenadantes que contenían los virus fueron recogidos para llevar a cabo los inmuno-marcajes con oro de los mismos, mientras que las células que expresan la construcción STX3-c-myc se fijaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con una solución de PFA al 4% más glutaraldehído (GA) al 0.25% en buffer PHEM (240 mM PIPES, 100 mM HEPES, 40 mM EGTA, 8mM MgCl_2 , pH 6.9). A continuación, se realizó una fijación adicional durante 90 minutos a 4°C con PFA al 2% más GA al 0.125% en buffer PHEM y las células se procesaron para su análisis mediante microscopía electrónica (ME).

Se obtuvieron crio secciones ultrafinas de 50 nm de grosor aproximadamente y se marcaron con un anticuerpo anti-c-myc seguido por una incubación con un antisuero de ratón conjugado con oro de 12 nm de diámetro (BritishBioCell, Cardiff, UK) en presencia de 10 % de suero humano para bloquear los receptores virales Fc. Las secciones marcadas fueron examinadas en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1011, las imágenes fueron recogidas en películas Kodak SO-163, los negativos se escanearon y las imágenes se transfirieron y se ensamblaron con el programa Adobe Photoshop.

La localización de las proteínas virales y celulares en virus aislados se llevó a cabo mediante el inmuno-marcaje con los anticuerpos contra marcadores escogidos seguido por incubación con proteína A (PAG), una proteína de origen bacteriano acoplada a partículas de oro de diferentes tamaños (10 o 15 nm, del laboratorio de ME, Universidad de Utrecht, Países Bajos), y su examen mediante ME. Las suspensiones de virus aislados procedentes de las células BJ1 infectadas, bien parentales o que expresan la STX3-c-myc, fueron fijados con una dilución de PFA al 4% en PBS, centrifugados en una microfuga de mesa durante 10





min a 4°C; el supernadante se descartó, las partículas virales se resuspendieron en PBS, se sonicaron y se mantuvieron a 4°C hasta su marcaje. Entonces, los virus fueron adsorbidos sobre rejillas de microscopía de cobre recubiertas con plástico Formvar y el marcaje se llevó a cabo depositando las rejillas sobre gotas de los reactivos correspondientes. Cuando el anticuerpo primario estaba dirigido contra epítomos citoplásmicos, proteínas transmembrana o proteínas dispuestas en la cara interna de la envoltura viral, las partículas virales se sometieron a un paso previo de permeabilización con saponina al 0,05% durante 3 minutos. De otro modo, el primer paso del marcaje consiste en una incubación con una dilución de suero humano al 10% en buffer Tris-HCl 30 mM, NaCl 150 mM, pH = 8.2, durante 7 minutos para bloquear los receptores Fc virales, seguido por una incubación con PAG acoplada a oro de 5 nm en buffer TBG (Tris-HCl 30 mM, NaCl 150 mM, pH = 8.2, albúmina de suero bovino, BSA, al 0.1% y gelatina al 1%) que se unirá al suero humano y evitará que los siguientes pasos de incubación con la PAG resulten inespecíficos. En virus con un contraste suave de tinción fuimos capaces de cuantificar $2,1 \pm 1,5$ partículas de oro de 5 nm por virión. Después de este tratamiento, fijamos la PAG unida al suero humano que bloquea los Fc virales con PFA al 4% en PBS y el fijador residual se inactivó con una incubación con NH_4Cl en PBS. Las rejillas se transfirieron a gotas que contenían el anticuerpo primario correspondiente diluido en buffer TBG durante 7 minutos. Cuando marcamos con determinados anticuerpos primarios monoclonales de ratón o con un anticuerpo policlonal de oveja, por los que la PAG tiene poca afinidad, hicimos un marcaje adicional con un anticuerpo de conejo anti-ratón o anti-cabra que actúa como puente entre la PAG y el anticuerpo primario, antes del marcaje con la PAG acoplada con oro de 10 nm o de 15 nm. Cuando realizamos dobles marcajes, las partículas virales se marcaron primero con un anticuerpo anti-CD63 monoclonal de ratón, un anticuerpo puente de conejo anti-ratón y PAG acoplada a oro de 10 nm y el oro unido se fijó con PFA al 4% en PBS. Después de neutralizar el exceso de fijador, llevamos a cabo un segundo paso de tinción con un anticuerpo anti-TGN46 de oveja, un puente de conejo anti-cabra y PAG acoplada a oro de 15 nm. Las rejillas se lavaron a continuación en 3 gotas de PBS y 5 gotas más de H_2O antes de su tinción con acetato de uranilo al 2% durante 30 s. La especificidad del marcaje se testó utilizando un anticuerpo contra la glicoproteína gD del VHS-I o bien omitiendo el anticuerpo primario. Las muestras se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1011, los viriones y los cuerpos densos, (“dense bodies”, DBs) se clasificaron de acuerdo a su tamaño, las partículas de ~200 nm de diámetro aproximadamente se clasificaron como viriones, y las partículas de mayor tamaño como DBs. Un mínimo de 20 partículas se analizaron en los controles y un mínimo de 100 partículas virales fue analizado para cada marcador y se determinó el número de partículas de oro asociadas a cada virión. Las imágenes se recogieron en películas Kodak SO-163, los negativos se escanearon y las imágenes se transfirieron y se ensamblaron con el programa Adobe Photoshop.

6 Ensayos de inmuno-precipitación de virus.

Los ensayos de inmunoprecipitación de virus los realizamos adaptando un procedimiento descrito previamente (Esser *et al.*, 2001). Para ello, diluimos las muestras virales hasta 1×10^6 unidades infecciosas por mL en una dilución de BSA al 3% en PBS que contenía los anticuerpos anti-CD63, anti-TGN46, anti-gH o anti-gB del CMVH, o anti gD del VHS-I a una concentración de 10 mg mL^{-1} en un volumen final de 100 μL . Las partículas virales se incubaron junto con los anticuerpos correspondientes durante la noche a 4°C. Las células “Pansorbin” (*Staphylococcus aureus* fijadas con formalina; Calbiochem) se prepararon lavándolas, bloqueándolas durante 1 hora a temperatura ambiente en PBS que contenía BSA al 3%, y se





añadieron sobre la mezcla de los virus con los anticuerpos. Esta mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y los virus capturados por la células Pansorbin fueron sedimentados mediante una centrifugación a 6000 rpm durante 1 minuto en una microfuga de mesa. Los sobrenadantes que contenían los virus que no fueron precipitados por los anticuerpos o que no contenían virus, se recogieron y se titularon sobre células BJ1 y el número de células que expresaban GFP fueron cuantificadas mediante análisis por citometría de flujo.

7 Análisis de la producción del CMVH en las células BJ1 que expresan los shRNAs o la construcción STX3-c-myc.

Para llevar a cabo los ensayos de infección por el CMVH, $2,5 \times 10^5$ células BJ1, transducidas con el shRNA control o con los shRNAs anti-STX3, se infectaron con la cepa recombinante del CMVH, RecCMV, a una MDI de 0,3 partículas infecciosas por célula. Para seleccionar las células que expresaban los shRNAs, se añadió puromicina al medio de cultivo, ya que el plásmido de expresión que contiene los shRNAs lleva un gen de resistencia a puromicina. A los 3 días tras la infección, algunas células se fijaron para cuantificar el número de ellas que expresaban la GFP mediante análisis por citometría de flujo. A los 4 días, algunas células se lisaron para cuantificar la expresión de la STX3 y de las proteínas virales mediante WB, mientras que el resto de las células se lavaron y se añadió medio de cultivo fresco para recoger los virus secretados al sobrenadante. Al día 5 post-infección, se recogieron los sobrenadantes y las células, y las partículas infecciosas tanto asociadas a las células como extracelulares se titularon en células BJ1 frescas como se ha descrito previamente (Fraile-Ramos *et al.*, 2007). En estas titulaciones, las células se fijaron a los 3 días post-infección, se analizaron mediante citometría de flujo y el número de células infectadas, es decir, el número de partículas virales infecciosas se detectó mediante la expresión de la GFP.

Para los ensayos de rescate de función de la STX3 en las células infectadas por el CMVH, las células BJ1 que expresaban una construcción vacía (células no resistentes) o una construcción STX3-c-myc resistente a la acción de los shRNAs anti-STX3 (células resistentes), se sembraron a una confluencia de $2,5 \times 10^5$ BJ1 células por pocillo, se transdujeron con los shRNAs control o shRNAs anti-STX3 y se infectaron con la cepa RecCMV y se procesaron como se ha descrito anteriormente.

8 Análisis de la producción del VHS-I en las células MeWo que expresan los shRNAs

Para los ensayos de infección del VHS-I, 6×10^5 células MeWo sin transducir, o que expresaban los shRNAs control o anti-STX3 se infectaron con el VHS-I a una MDI de 0,5. A las 24 tras la infección, una parte de las células se lisó para analizar los niveles de expresión de la STX3 y de la glicoproteína viral gB del virus mediante WB. El resto de las células y los sobrenadantes se recogieron para determinar el número de partículas infecciosas asociadas a las células y presentes en los sobrenadantes mediante su titulación en células Vero. En estos ensayos, las monocapas de células infectadas se fijaron con una mezcla de metanol:acetona (1:1) y el número de células infectadas, es decir, los foci virales, se detectaron mediante una mezcla de los anticuerpos anti-gB y anti-gD del VHS-2, que reaccionan de modo cruzado con sus proteínas homólogas en VHS-I, y anticuerpos secundarios acoplados a la peroxidasa de rábano ("horse radish peroxidase", HRP) que se detectó mediante su reacción a la di-aminobencidina (DAB).





9 Western blot.

Cuando se llevó a cabo el análisis de la expresión de los marcadores celulares, el mismo número de células BJ1 sin infectar o infectadas con la cepa Towne del CMVH con una MDI de 3 partículas infecciosas por célula, se lisaron a día 0 para las células sin infectar o a los 4 días tras la infección en buffer RIPA (Tris-HCl 20 mM, pH 7,8, NaCl 150 mM suplementado con Nonidet P-40 1%, deoxicolato sódico 1%, SDS 0.1% y EDTA 2 mM) con inhibidores de proteasas. Los núcleos celulares fueron separados junto con los restos celulares mediante una centrifugación a 14000 rpm en una microfuga de mesa durante 10 min a 4°C y los lisados se cargaron en geles de SDS-poliacrilamida al 10% en condiciones no reductoras.

El análisis de la expresión de los marcadores celulares en las partículas virales secretadas a los sobrenadantes, se llevó a cabo infectando células BJ1 a una MDI de 3, o bien manteniéndolas sin infectar. A día 0 o a día 4 tras la infección, se recogieron los sobrenadantes y se eliminaron los restos celulares mediante la centrifugación como se ha descrito anteriormente. Los virus presentes en un volumen de 1,5 mL de sobrenadante se concentraron mediante una centrifugación a 10000 rpm en microfuga de mesa durante 10 minutos a 4°C, se recuperaron y se lisaron en 10 µL de buffer de lisis SDS-PAGE no reductor y las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10%.

La expresión de las proteínas celulares presentes en los viriones purificados se estudió cargando 35 ng de virus purificados por pocillo resuspendidos en 10 µL de buffer de lisis SDS-PAGE no reductor como en el caso anterior.

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore) y los blots que contenían los lisados celulares se revelaron utilizando el reactivo SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific), mientras que los blots con los lisados procedentes de sobrenadantes y de viriones purificados se revelaron con el reactivo SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific), que permite que el método alcance una mayor sensibilidad. Las autorradiografías resultantes se escanearon y las bandas se cuantificaron mediante el programa de dominio público ImageJ 1.33 (desarrollado en el National Institute of Health de los EEUU, y accesible en Internet en el sitio <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Para los lisados celulares, la cantidad de proteína cargada se normalizó respecto al contenido en la cadena pesada de la clatrina o en la expresión de la actina. En el caso de los sobrenadantes virales y de los viriones purificados, la presencia de virus se confirmó detectando la proteína viral del tegumento pp28. Las imágenes se cortaron y se ensamblaron con Adobe Photoshop.

El estudio de la expresión de la STX3 durante la infección por el CMVH se llevó a cabo infectando células BJ1 con la cepa Towne a una MDI de 3, o manteniéndolas sin infectar. Las células sin infectar se lisaron a tiempo 0 mientras que las células infectadas se lisaron a 1, 2, 3, 4, y 5 días post-infección en 100 µL de buffer de lisis SDS-PAGE no reductor y los lisados se procesaron para su análisis mediante WB como se ha explicado anteriormente.

Para el análisis de la expresión de la STX3 en los estudios funcionales, las células BJ1 o MeWo sin transducir o transducidas con los shRNAs control o anti-STX3, se infectaron con los virus RecCMV o VHS-1 respectivamente a MDI de 1 partícula infecciosa por célula y fueron lisadas con 60 µL de buffer de lisis SDS-PAGE no reductor. La expresión de las proteínas del CMVH se testó utilizando un suero





positivo para el CMVH ya que se ha descrito que el suero de pacientes infectados por el CMVH reacciona con varias proteínas virales estructurales (Nowak *et al.*, 1984). Se incluyó un control utilizando un suero negativo para el CMVH y no se observó reactividad en este caso (datos no mostrados).

10 Análisis de monocapas de células infectadas por el CMVH mediante ME.

Células BJ1 que expresan los shRNAs control o anti-STX3 se crecieron hasta alcanzar la confluencia en cubreobjetos de plástico Thermanox® (NUNC) y se infectaron con la cepa recombinante del CMVH RecCMV a una MDI de 0,5 partículas infecciosas por célula. A los 4 días tras la infección, algunas células se lisaron para examinar la expresión de la STX3 por WB. A los 5 días, los sobrenadantes se recogieron para determinar el número de partículas infecciosas producidas y las monocapas celulares se fijaron durante 1 hora en glutaraldehído al 1% ácido tánico al 0,5% en buffer fosfato y fueron procesadas mediante su inclusión “*in situ*” en la epoxi-resina EML-812 (Taab Laboratories, Adermaston, Berkshire, Reino Unido) como se describió (Fontana *et al.*, 2008). Recogimos secciones ultrafinas de 70 nm consecutivas paralelas a la superficie del cubreobjetos de Thermanox desde la base de la célula hasta la superficie cada 0.5 μm , en rejillas de cobre con barras paralelas recubiertas por Formvar, y examinamos estas secciones en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1011. Encontramos que el área de ensamblaje se dispone alrededor del centro organizador de microtúbulos (“microtubule organising center”, MTOC) como se había descrito anteriormente (Sanchez *et al.*, 2000a) y se localiza entre 2 μm y 5 μm de altura desde la base de la célula. Reconstruimos la zona de ensamblaje a través de las series de cortes cada 0.5 μm , fotografiando el área celular completa de las secciones escogidas. En cada sección, se tomaron ~40 micrografías a una magnificación de 30000x hasta cubrir el área completa de la célula con detalle suficiente como para cuantificar las partículas virales intracelulares. Se analizaron un mínimo de 5 células control o silenciadas; las imágenes se tomaron con una cámara CCD modelo ES1000W Erlangshen (Gatan Inc., California, EEUU), se transfirieron a Adobe Photoshop, impresas y ensambladas para recrear el área de ensamblaje. Teniendo en cuenta que las células analizadas tenían diferente tamaño, normalizamos nuestras cuantificaciones en función del volumen celular, el cual calculamos midiendo el área celular utilizando el programa informático público ImageJ 1.33. Para cada célula, cuantificamos las partículas virales en el proceso de envolvimiento o completamente envueltas a través de toda la zona de ensamblaje recreada.

11 Análisis de pulso y caza de CD63

8×10^5 células MeWo crecidas en placas de cultivo de 60 mm que expresaban los shRNAs control o anti-STX3, se incubaron con medio sin metionina ni cisteína durante 30 minutos seguido por una incubación metabólica durante 16h con un medio que contenía 200 $\mu\text{Ci/mL}$ metionina- ^{35}S y se lisaron inmediatamente o fueron incubados a diferentes tiempos en medio completo fresco que contenía un exceso de metionina no marcada. El CD63 fue inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-CD63 TEA 3/18 y analizado mediante geles de SDS-PAGE y autorradiografía. Como control de la inmunoprecipitación no específica, lisados celulares a tiempo 0 fueron incubados con un anticuerpo contra la proteína del tegumento viral pp28 e inmunoprecipitados. Las películas de autorradiografía fueron escaneadas y las bandas se cuantificaron como se ha descrito arriba.





resultados







I Caracterización de la naturaleza de los compartimentos celulares donde se ensambla el CMVH

I.1 Diferentes marcadores celulares de las rutas exocítica y endocítica se reclutan al lugar de ensamblaje viral en las células infectadas por el CMVH.

La etapa final del ensamblaje de las partículas virales del citomegalovirus humano (CMVH) consiste en la adquisición de la envoltura viral. Este proceso se lleva a cabo mediante el envolvimiento de las cápsidas virales, rodeadas de las proteínas del tegumento, en cisternas membranosas derivadas de los sistemas de membranas celulares; sin embargo, el origen de estas membranas es aún incierto. Este último paso de la morfogénesis del CMVH ocurre en la zona perinuclear de la célula; una región que contiene un entramado complejo de estructuras membranosas pertenecientes a diferentes orgánulos, vesículas y túbulos. Con el objetivo de comprender mejor los cambios que induce el CMVH en los sistemas de membranas celulares

y de desentrañar el origen y naturaleza de las vesículas y los túbulos donde el virus completa su envolvimiento final, realizamos una serie de estudios de doble inmunofluorescencia (IF) tanto en células sin infectar como en células infectadas, usando marcadores celulares bien caracterizados y anticuerpos contra las proteínas de la envoltura viral como son la glicoproteína gH, que es una proteína viral esencial en el proceso de la infección por el CMVH, o la proteína semejante a los receptores de las quimioquinas, UL33, que se acumulan en el lugar de ensamblaje viral.

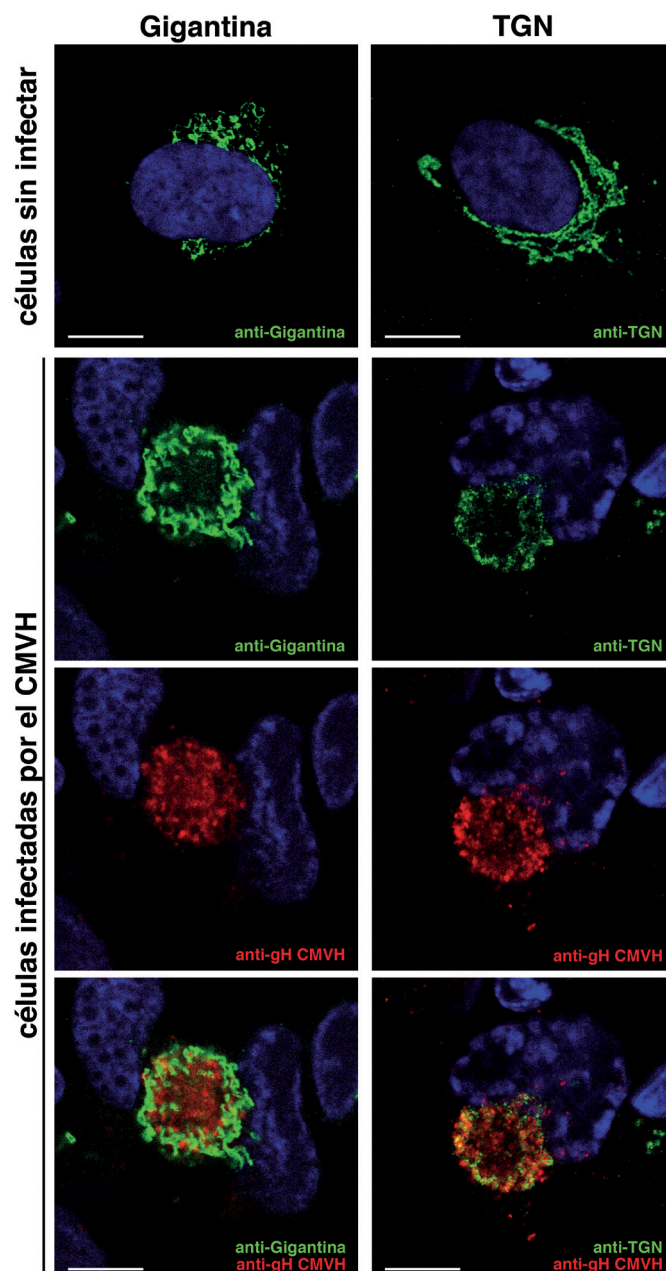


Figura 6
Localización subcelular de los marcadores de la ruta exocítica gigantina y TGN46 en las células infectadas por el CMVH. La gigantina (en verde) se encontró rodeando el lugar de ensamblaje en las células infectadas marcado por la glicoproteína viral gB (en rojo), mientras que el TGN46 (en verde) se detectó acumulado en el lugar de ensamblaje junto con la gB. Escala, 20 μ m.

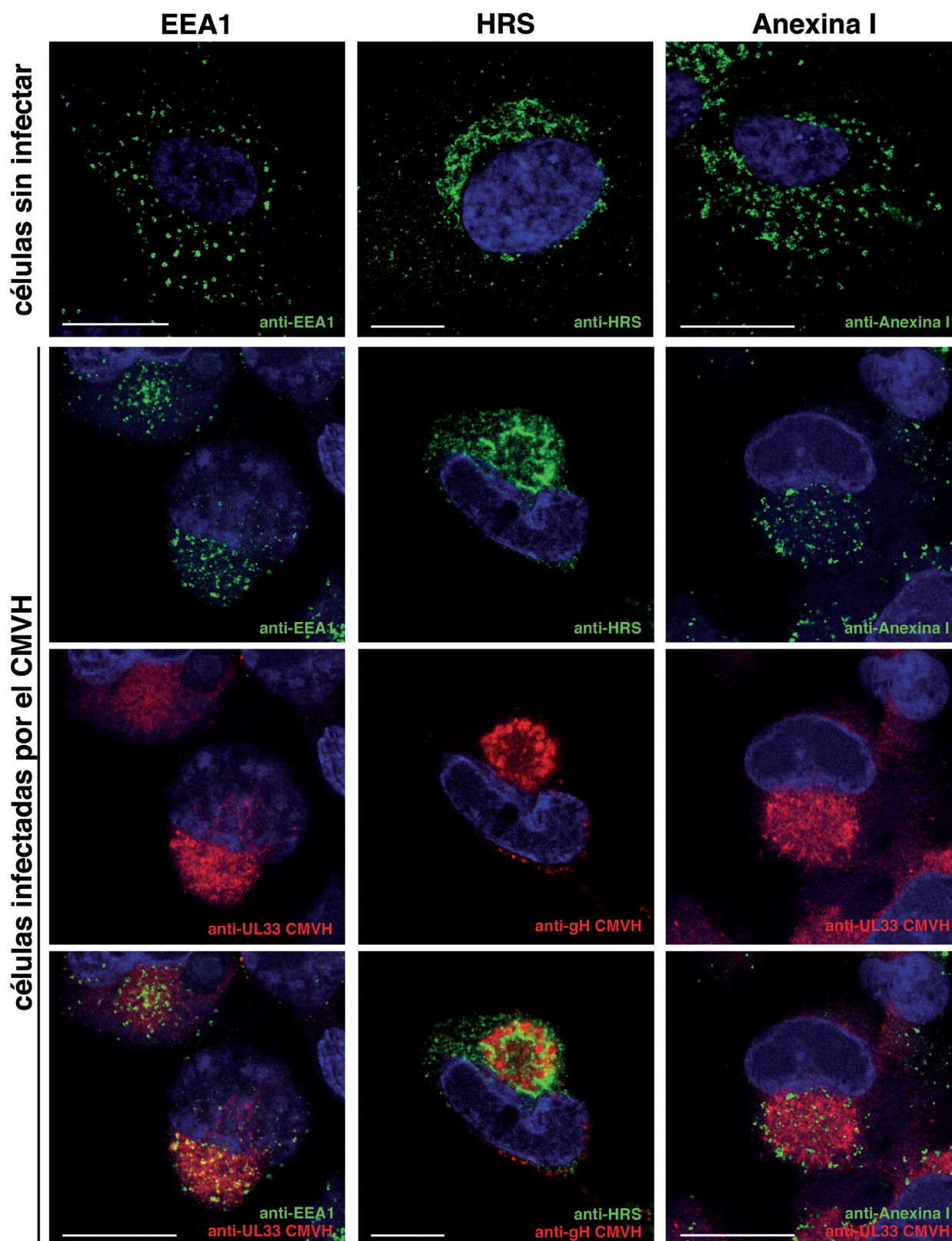


Figura 7

Localización subcelular de los marcadores de endosomas EEA1, HRS y anexina I en las células infectadas por el CMV. Los marcadores EEA1 y anexina I (en verde) que presentan una distribución punteada por todo el citoplasma en las células sin infectar, se relocalizaron al área de ensamblaje en las células infectadas y están en estrecho contacto con estructuras positivas para la proteína viral UL33 (en rojo); mientras que el marcador HRS se encontró en el área de ensamblaje viral. Escala, 20 μ m.

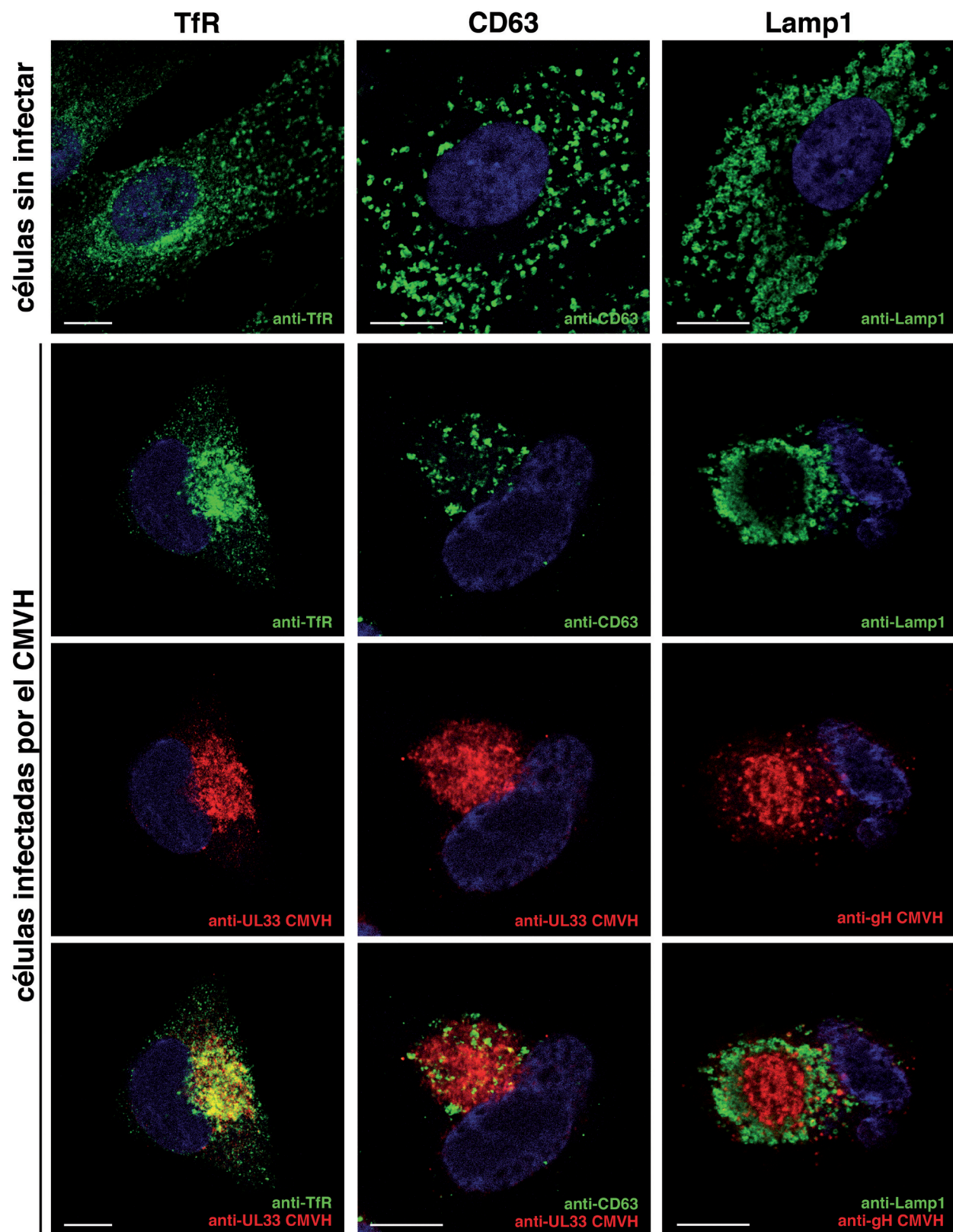


Figura 8

Localización subcelular de los marcadores de los endosomas de reciclaje (el receptor de la transferrina, TfR), de los MVBs (CD63) y de los lisosomas (Lamp1) en las células infectadas por el CMVH. El TfR (en verde, paneles a la izq.) se reclutó a la zona de ensamblaje co-localizando con la proteína viral UL33 (en rojo), CD63 (en verde, paneles en el medio) se relocalizó al área de ensamblaje y el Lamp1 (en verde, paneles a la dcha.) se detectó excluido de éste área. Escala, 20 μ m.



Comenzamos esta serie de experimentos tiñendo fibroblastos de prepucio humanos inmortalizados, células BJ1, con dos marcadores de la ruta exocítica de transporte celular. El patrón de distribución que se obtiene cuando se tiñen las células con el marcador del aparato de Golgi, Gigantina, o con el marcador de la red de vesículas de la cara *trans*- del aparato de Golgi (“trans-Golgi-network”, TGN), TGN46, es un patrón en forma de lazo (**Fig. 6**, paneles superiores).

Sin embargo, en las células BJ1 infectadas por el CMVH, el patrón de distribución del marcador del aparato de Golgi resulta ser una estructura en forma de anillo que se encuentra situada rodeando la zona de ensamblaje de los nuevos viriones donde se acumula la glicoproteína viral gH. Para determinar si el marcador Gigantina se encontraba asociado a la proteína gH, cuantificamos el grado de solapamiento entre ambos marcadores calculando el coeficiente de solapamiento de Manders, R , donde $R = 0$ significa que no existe ningún solapamiento entre las proteínas y $R = 1$ significa que hay un solapamiento completo. El coeficiente de Manders resultó ser bajo para estas dos proteínas, $R = 0.30 \pm 0.05$. En el caso del marcador de la red del *trans*-Golgi, en las células infectadas éste se encuentra inserto dentro de la región de ensamblaje viral y presenta un solapamiento parcial con la glicoproteína viral gH, con un coeficiente de solapamiento $R = 0.42 \pm 0.10$ (**Fig. 6**, paneles inferiores).

A continuación, analizamos la distribución de varios marcadores de la ruta endocítica de transporte celular, en particular marcadores de endosomas, en las células infectadas por el CMVH. Como marcadores de los endosomas tempranos, utilizamos el marcador del antígeno-I de endosomas tempranos, (“early endosome antigen-1”, EEA1), el sustrato de la tirosina quinasa regulado por el factor de crecimiento de hepatocitos (“hepatocyte growth factor-regulated Tyr-kinase substrate”, HRS), y la proteína anexina I. En las células BJ1 sin infectar, el marcador EEA1 se localiza en una serie de estructuras de tipo toroidal distribuidas homogéneamente por todo el citoplasma, mientras que en el caso de las células infectadas por el CMVH encontramos estas estructuras en la zona de ensamblaje (**Fig. 7**, paneles superiores a la izquierda), tal y como se había descrito previamente para esta proteína (Das et al., 2007). Cuando examinamos detenidamente este marcaje, detectamos que las estructuras positivas para EEA1 se localizaban en la zona de ensamblaje marcada por la proteína viral semejante a un receptor de quimioquinas, UL33 (**Fig. 7**, paneles inferiores a la izquierda); cuando determinamos el coeficiente de solapamiento entre éstas dos proteínas encontramos cierta co-localización entre ellas, $R = 0.46 \pm 0.04$, lo que es consistente con nuestro anterior estudio donde mostramos que la proteína UL33 se encuentra en compartimentos de la ruta endocítica (Fraile-Ramos et al., 2002).

El marcador HRS también se encuentra en la zona de ensamblaje viral aunque su coeficiente de co-localización con la proteína gH del CMVH es bajo, $R = 0.29 \pm 0.06$ (**Fig. 7**, paneles en el medio). La proteína anexina I aparece marcando estructuras en forma de puntos dispersos por el citoplasma en las células sin infectar (**Fig. 7** paneles superiores a la derecha), mientras que en las células infectadas aparece relocalizada en el área de ensamblaje viral aunque no parece que co-localice con la proteína viral UL33, $R = 0.31 \pm 0.10$ (**Fig. 7** paneles inferiores a la derecha).

El receptor de la transferrina, TfR, está continuamente transportándose desde los endosomas hasta la membrana plasmática y viceversa. Aunque en el estado estacionario la mayor parte de este receptor se encuentra localizada en los endosomas de reciclaje (Yamashiro et al., 1984), en las células BJ1 sin infectar, el marcador TfR aparece tiñendo estructuras tubulares en la zona perinuclear, donde suelen localizarse los endosomas de reciclaje, y también estructuras en forma de puntos dispersas por todo el citoplasma

(Fig. 8, panel superior a la izquierda). Sin embargo, en las células infectadas por el CMVH, TfR se acumula en la región de ensamblaje de los nuevos viriones y presenta una co-localización bastante alta, aunque no completa, con la proteína viral UL33, $R = 0.87 \pm 0.03$ (Fig. 8, paneles inferiores a la izquierda).

Un marcador bien definido de los MVBs es la tetraspanina CD63. Éste aparece marcando estructuras en forma de puntos repartidas a lo largo del citoplasma de las células BJI sin infectar (Fig. 8, panel superior en el centro). Por el contrario, en las células infectadas, CD63 aparece localizado en la zona de ensamblaje aunque el solapamiento observado entre este marcador y la proteína viral UL33 es bajo, $R = 0.29 \pm 0.08$ (Fig. 8, panel inferior en el centro).

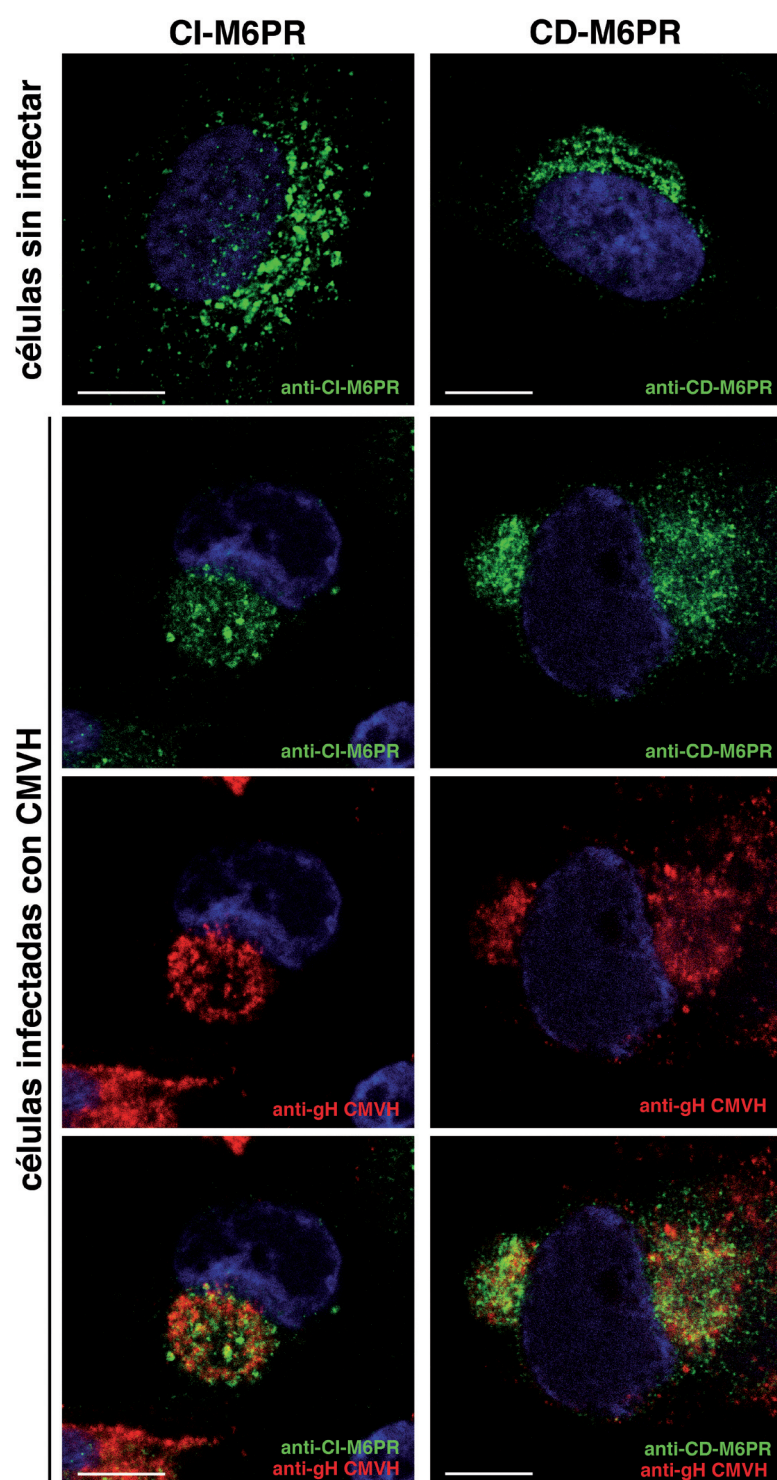


Figura 9 Localización subcelular de los marcadores de los receptores de la manosa-6-fosfato (M6PRs) en las células infectadas por el CMVH. Ambos receptores, CI-M6PR y CD-M6PR (en verde), se detectaron en el lugar de ensamblaje viral en las células infectadas marcada por la gH viral (en rojo). Escala, 20 μm .

El marcador de lisosomas Lamp1 marca estructuras vesiculares que se distribuyen por todo el citoplasma de las células BJ1 sin infectar (**Fig. 8**, panel superior a la derecha), sin embargo, en las células infectadas este marcador aparece excluido de la región de ensamblaje viral, posicionándose alrededor de esta zona donde se acumula la glicoproteína viral gH, $R = 0.33 \pm 0.03$ (**Fig. 8** paneles inferiores a la derecha). Cuando teñimos las células BJ1 con otro marcador de lisosomas, Lamp2, observamos un resultado similar al anterior (datos no mostrados).

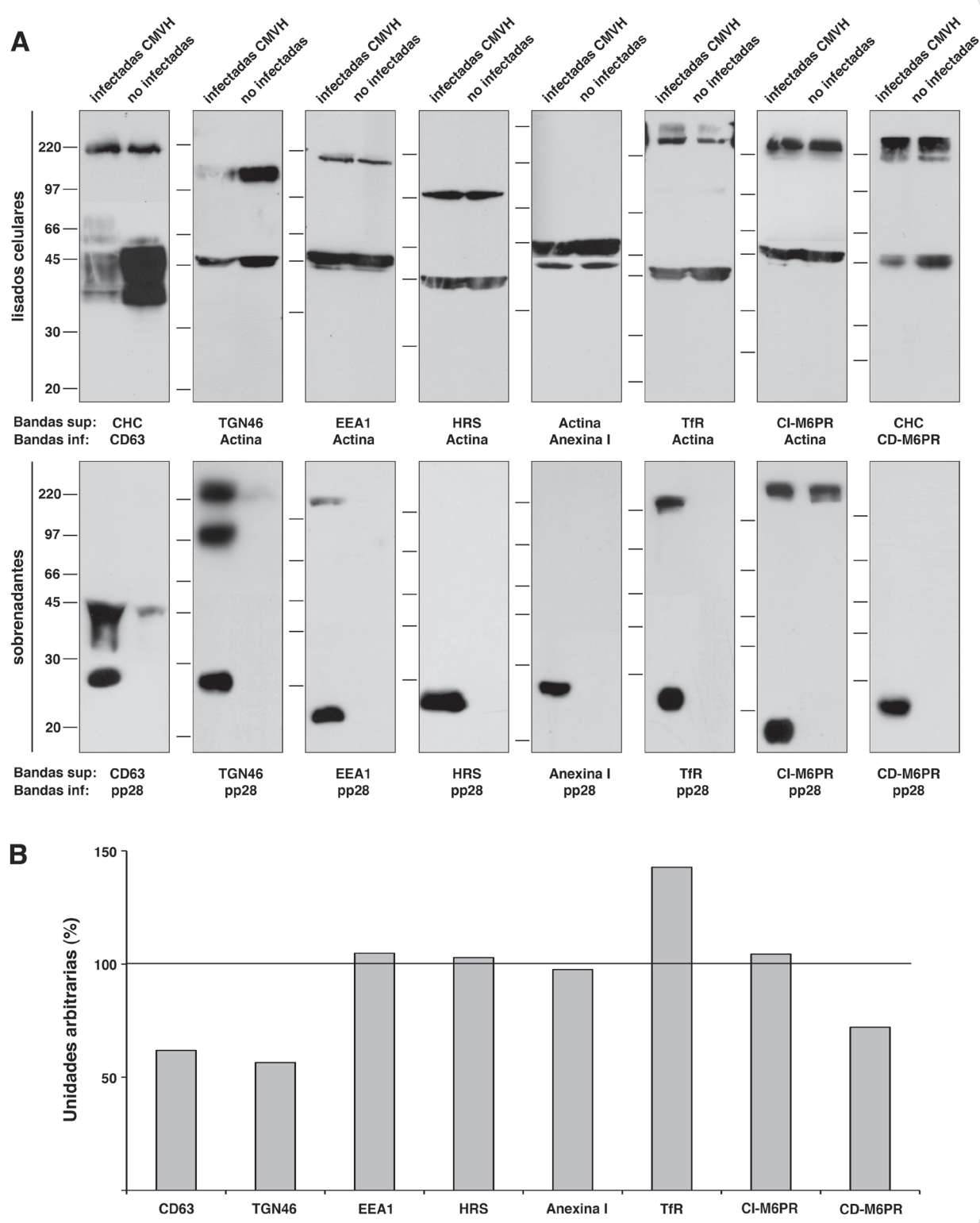
A continuación, estudiamos la distribución de las vesículas de transporte entre la red del *trans*-Golgi y los endosomas, utilizando para ello anticuerpos contra los receptores de la manosa-6-fosfato (“*mannose 6-phosphate receptors*”, M6PRs): el receptor independiente de cationes (“*cation independent M6PR*”, CI-M6PR) y el receptor dependiente de cationes (“*cation dependent M6PR*”, CD-M6PR), que están implicados en el transporte de las enzimas lisosomales (Klumperman *et al.*, 1993). En las células BJ1 sin infectar, las estructuras en forma de puntos positivas para los receptores de la manosa 6-fosfato se encuentran sobre todo en la región perinuclear (**Fig. 9** paneles superiores). El marcador CI-M6PR se acumula en el lugar de ensamblaje y presenta cierto grado de co-localización con la glicoproteína viral gH, $R = 0.49 \pm 0.05$, (**Fig. 9**, panel inferior a la izquierda); por su parte, el marcador CD-M6PR se distribuye en forma de puntos pequeños dispersos por el citoplasma celular y solapa en cierto grado con la glicoproteína gH, $R = 0.59 \pm 0.10$; **Fig. 9**, panel inferior a la derecha).

Cuando examinamos en conjunto todos estos datos, detectamos que el CMVH induce cambios significativos en los sistemas de membranas celulares, tanto en las membranas asociadas a la ruta exocítica como en las asociadas a la ruta endocítica de transporte. A la vista de estos resultados, parece que las membranas positivas para el marcador de la red de vesículas del *trans*-Golgi, TGN y las membranas de endosomas se reclutan a la región de ensamblaje de los nuevos viriones, mientras que el aparato de Golgi y los lisosomas están excluidos de este área y se disponen alrededor del lugar de ensamblaje. Estos resultados sugieren que tanto las membranas positivas para TGN como las membranas positivas para los marcadores de endosomas están implicadas en la adquisición de la envoltura viral.

1.2 El CMVH altera la transcripción y la expresión de algunos marcadores celulares.

Los análisis de los marcadores celulares que se encuentran asociados al área de ensamblaje viral mediante IF no sólo mostraron cómo el virus altera su distribución, sino que también revelaron cambios en la expresión de algunos de ellos. Para cuantificar estos posibles cambios a nivel de expresión de proteína, llevamos a cabo un análisis mediante Western blot (WB).

Al estudiar los niveles de los marcadores de endosomas tempranos EEA1, HRS y anexina I, y del marcador de vesículas del *trans*-Golgi a los endosomas CI-M6PR en los lisados procedentes de células infectadas por el CMVH, éstos no aparecían alterados significativamente por la infección (**Fig. 10 A** paneles superiores). Sin embargo, encontramos una disminución del ~43%, ~38% y del ~28% en los niveles de expresión de los marcadores TGN46, CD63 y CD-M6PR respectivamente. Al contrario, mientras que la expresión del marcador TfR se encontraba aumentada en un ~42% en las células infectadas por el virus (**Fig. 10 A** paneles superiores).

**Figura 10****Examen de marcadores celulares en los lisados y en los sobrenadantes de las células infectadas por el CMVH. A.**

Análisis mediante WB de la expresión de proteínas celulares. La cantidad de proteína fue normalizada mediante la detección de la actina o bien de la cadena pesada de la clatrina. Los pesos moleculares se indican en kDa. Detectamos que CD63, EEA1, TfR y CI-M6PR en los sobrenadantes de las células infectadas a día 4 tras al infección. **B.** La expresión de los marcadores celulares en los lisados en (A) se cuantificó mediante densitometría, normalizando según la cantidad de proteína y se expresaron en forma de porcentaje siendo el 100% el nivel de la proteína en las células sin infectar. En las células infectadas, observamos una reducción en los niveles del CD63, TGN46 y CD-M6PR y un incremento en los niveles del TfR, comparado con las células sin infectar.

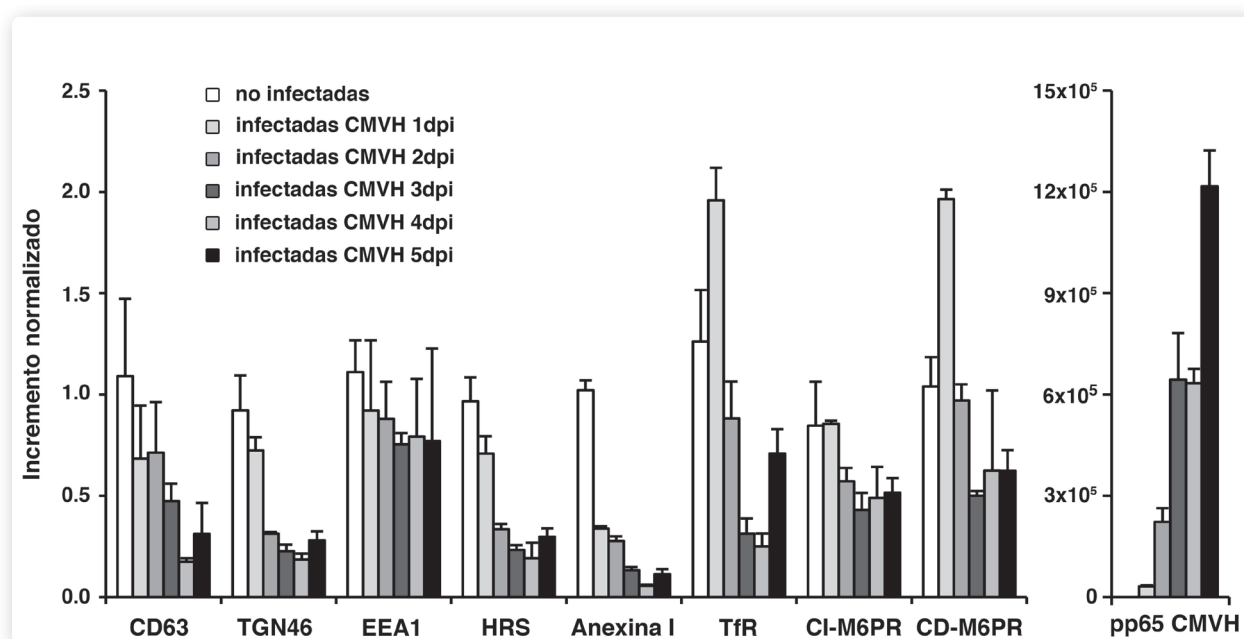


Figura 11

Regulación transcripcional de los marcadores celulares durante la infección por el CMVH. Regulación transcripcional de los marcadores celulares y de la proteína viral pp65 durante la infección, medida por qRT-PCR y normalizada respecto al ARNr 18S. La transcripción de CD63, TGN46, HRS y anexina I se redujo durante la infección. La transcripción de EEA1 y CI-M6PR apenas varió mientras que la de TfR y CD-M6PR se indujo transitoriamente a día 1 y después bajó. Los niveles de transcripción de la pp65 aumentaron durante la infección. Los niveles de expresión de los marcadores durante la infección viral están expresados como porcentaje y normalizados respecto a la carga de proteína mediante la cuantificación de la actina.

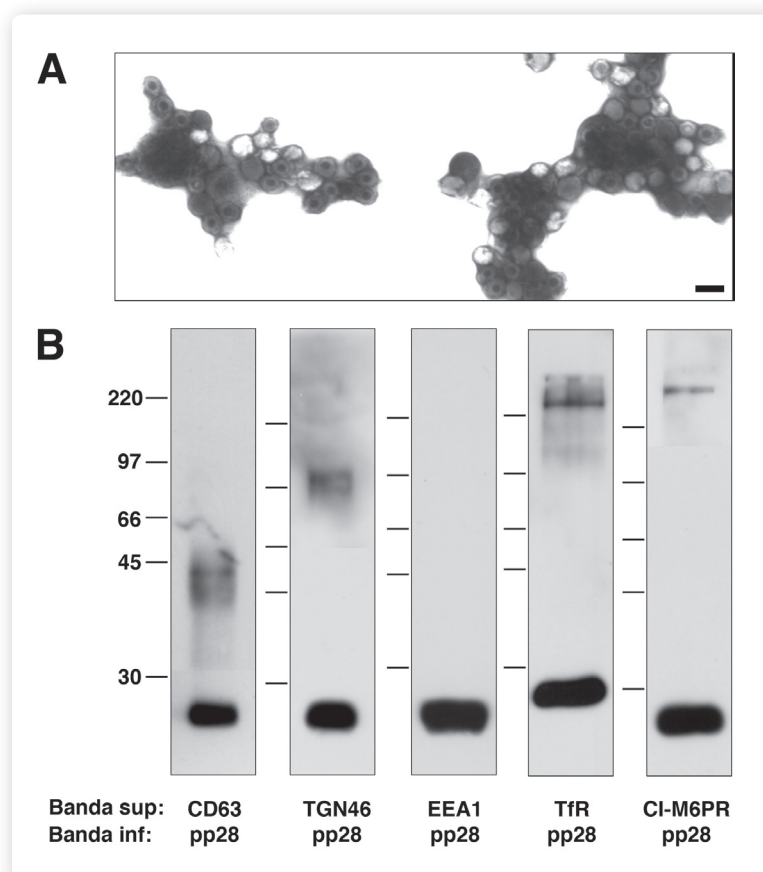


Figura 12

Examen de los marcadores celulares en los viriones purificados del CMVH. A. Análisis por microscopía electrónica de los viriones purificados teñidos negativamente con acetato de uranilo. Cuando el agente de tinción penetra en las partículas, se revelan las nucleocápsidas. Escala, 200 nm. B. Lisados procedentes de viriones purificados. Los pesos moleculares se muestran en kDa. Detectamos los marcadores CD63, TGN46, TfR y CI-M6PR en los viriones purificados.



A continuación, y para profundizar en las posibles causas de la alteración que observamos en los niveles de expresión de estas proteínas en las células infectadas por el CMVH, estudiamos sus niveles de ARNs mensajeros en la célula a diferentes tiempos tras la infección por el virus mediante la reacción en cadena de la polimerasa (“*Polimerase Chain Reaction*”, PCR) cuantitativa a tiempo real (“*Quantitative Real Time PCR*”, qRT-PCR) (**Fig. 11**). Al comparar los niveles de ARNs mensajeros de estos marcadores en las células infectadas con los que existen en las células sin infectar, observamos que los niveles de mensajeros de los marcadores TGN46, CD63, HRS y anexina I disminuyen progresivamente durante el curso de la infección, mientras que los niveles de los ARNs mensajeros de EEA1 y CI-M6PR no varían significativamente tras la infección por el virus. Por su parte, los niveles de mensajeros del marcador TfR aumentan transitoriamente el día 1 post-infección, y descienden el día 3 post-infección, aumentando de nuevo a día 5 post-infección. Los niveles de ARN mensajero de la proteína CD-M6PR también aumentan transitoriamente en el día 1 post-infección, decaen al día 3 post-infección tras lo cual se mantienen estables durante el curso de la infección.

La bajada que detectamos en los niveles de ARNs mensajeros de los marcadores TGN46, CD63 y CD-M6PR se corresponden con la reducción en la expresión de estas proteínas que observamos mediante WB (**Fig. 10**), mientras que las ligeras variaciones en los niveles de ARNs mensajeros de los marcadores EEA1 y CI-M6PR resultan coherentes con la expresión estable de estas proteínas que revela el análisis mediante WB. Por el contrario, el descenso de los niveles de mensajeros de HRS y anexina I no parece corresponderse con la expresión de las proteínas, que aparentemente permanece invariable. Además, los niveles de mensajeros del marcador TfR parece que se reducen durante la infección mientras que los niveles de expresión de la proteína parecen aumentar.

Los datos obtenidos de estos estudios de expresión de proteínas y de ARNs mensajeros sugieren que el CMVH podría regular la expresión de algunos marcadores celulares, no solamente a nivel de la expresión/degradación de las proteínas sino también a nivel de la transcripción génica.

1.3 Algunos marcadores celulares se encuentran incorporados en la envoltura del CMVH.

Tras detectar los cambios en la expresión de ciertos marcadores celulares tras la infección por el CMVH, nos preguntamos si estas proteínas se encontraban presentes en las membranas que el virus utiliza para adquirir su envoltura y, en consecuencia, si se incorporaban a la envoltura viral.

Para responder a esta cuestión, realizamos un análisis mediante WB de los sobrenadantes de las células BJI, tanto infectadas como sin infectar, con la intención de detectar estos marcadores en los viriones secretados a los sobrenadantes de las células infectadas. En este caso, observamos que el marcador CI-M6PR, y el marcador CD63 en menor medida, se detectan en los sobrenadantes de las células sin infectar (**Fig. 12 A**, paneles inferiores).

Este interesante resultado sugiere que estas dos proteínas podrían ser secretadas al medio extracelular. Por otro lado, cuando analizamos mediante WB los sobrenadantes de las células infectadas, encontramos las bandas correspondientes al peso molecular esperado para los marcadores TGN46, EEA1, TfR, CD63 y CI-M6PR (**Fig. 12 A**, paneles inferiores). Como curiosidad, examinando las bandas correspondientes a los sobrenadantes de las células infectadas, detectamos que el anticuerpo anti-TGN46 produce además una banda de alto peso molecular (~225 kDa), que podría ser debida a la formación de dímeros de



TGN46. La presencia de estas proteínas en los sobrenadantes de las células infectadas sugiere que podrían estar incorporadas en los viriones secretados al medio extracelular. Sin embargo, no podíamos excluir la posibilidad de que la presencia en los sobrenadantes fuera debida a que el CMVH indujese la secreción de estas proteínas celulares al medio extracelular o bien que los sobrenadantes contuviesen restos celulares residuales. De manera que, para determinar si estos marcadores celulares se encontraban realmente asociados a los viriones, purificamos partículas virales de CMVH secretadas al sobrenadante mediante gradientes de glicerol-tartrato (Talbot *et al.*, 1977) y las sometimos a análisis mediante WB. Para asegurarnos de que las fracciones de los viriones purificados sólo contenían viriones llevamos a cabo un examen mediante microscopía electrónica. Así, observamos partículas virales con envoltura (**Fig. 12 A**) de las cuales, algunas presentaban envolturas parcialmente desprendidas, probablemente debido al propio proceso de purificación. Una vez comprobado el estado de pureza, el análisis por WB reveló la presencia de los marcadores TGN46, TfR, CD63 y CI-M6PR en los viriones purificados, lo que demuestra su incorporación en la envoltura viral. La detección del marcador EEA1 en los sobrenadantes de la células infectadas (**Fig. 10 A**) pero no en los viriones purificados (**Fig. 12 B**) indica que este marcador de endosomas posiblemente

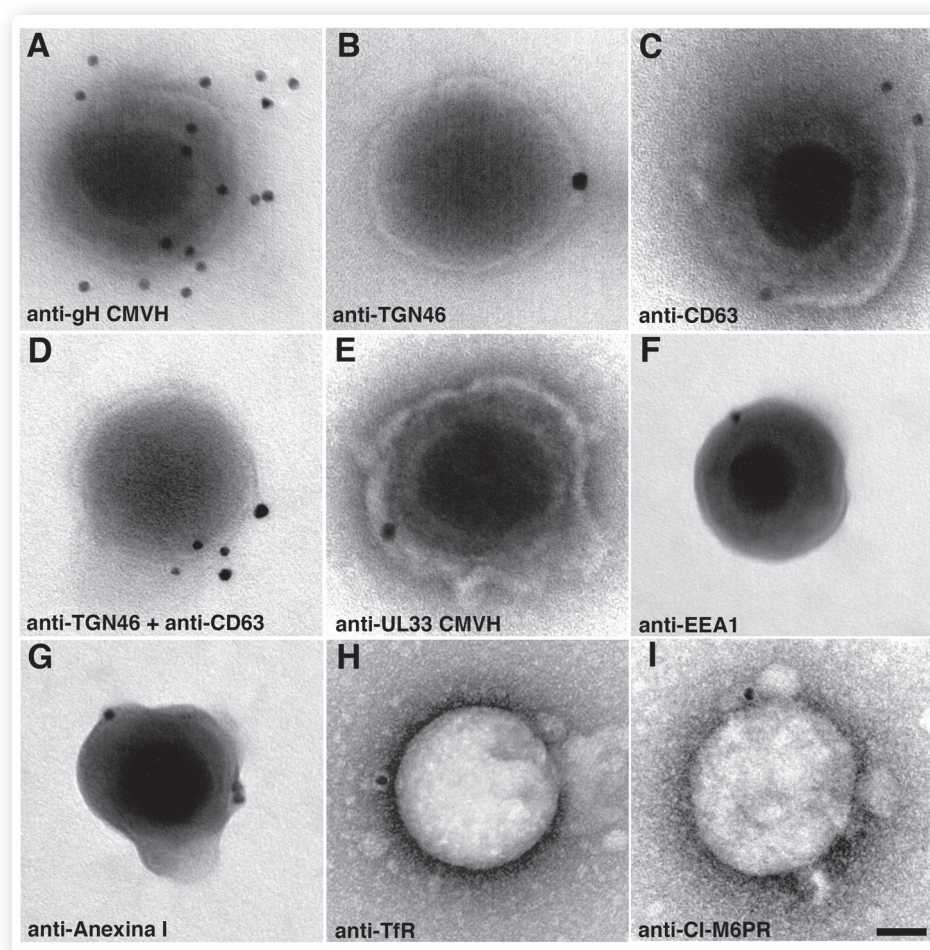


Figura 13

Localización mediante inmuno-marcaje con oro de proteínas virales y celulares en la envoltura de las partículas virales aisladas. Las partículas virales fueron teñidas con anticuerpos contra la glicoproteína viral gH (A, PAG₁₀) y la proteína viral UL33 (E, PAG₁₅), TGN46 (B, PAG₁₅), CD63 (C, PAG₁₀), EEA1 (F, PAG₁₀), anexina I (G, PAG₁₀), dominio luminal del TfR (H, PAG₁₀), CI-M6PR (I, PAG₁₀), bien sin permeabilizar (A-D, H-I) o permeabilizadas con saponina (E-G). D, doble inmuno-marcaje con anticuerpos anti-CD63 (PAG₁₀) y anti-TGN46 (PAG₁₅). Cuando el agente de tinción penetra en las partículas, se revelan las núcleo-cápsidas. Escala, 50 nm.

no se incorpora en los viriones o, lo que es más probable, que los niveles de la proteína EEA1 presente en los viriones purificados está por debajo del límite de detección del ensayo de WB.

Este conjunto de resultados muestra que los marcadores TGN46, EEA1, TfR, CD63 y CI-M6PR se encuentran presentes en los sobrenadantes de células infectadas por el CMVH y en los viriones purificados, lo que resulta una importante evidencia de su incorporación en la envoltura.

Para confirmar la posible incorporación de los marcadores celulares que están asociados con el lugar de ensamblaje a la envoltura viral, llevamos a cabo una aproximación morfológica mediante la cual incubamos las partículas virales secretadas a los sobrenadantes con anticuerpos y reactivos asociados con oro, las teñimos con acetato de uranilo y examinamos estas tinciones negativas en el microscopio electrónico. En primer lugar, observamos la presencia de dos tipos de partículas virales con envoltura: partículas esféricas de ~200 nm de diámetro que corresponden a viriones de CMVH y otras partículas más grandes que corresponden a los llamados cuerpos densos (“dense bodies”, DBs). Estas partículas son acumulaciones

marcadores	control sin anticuerpo primario	viriones positivos	cuerpos densos positivos	Oro por partícula	% viriones positivos	% cuerpos densos positivos
Virales						
HCMV gH	2(25)	97 (137)	75 (112)	7.9±2.6	62.9	59.3
HCMV UL33	1(24)	64 (141)	72 (151)	1.1±0.3	41.4	43.7
VHS-I AP7	1(25)	4(110)	5(125)	1.0±0.0	0.0	0.0
Endocíticos						
CD63	1(25)	77 (125)	73 (110)	3.1±1.5	58.0	62.4
Annexin I	1(28)	40 (108)	35 (103)	2.5±1.1	33.5	30.5
EEA1	1(28)	35 (115)	37 (127)	1.7±0.6	26.9	25.6
HRS	1(25)	8(128)	6(120)	1.0±0.0	2.3	1
TFR	1(23)	50(105)	52(115)	1.9±0.6	43.3	40.9
trans-Golgi -network						
TGN	1(25)	50 (120)	36 (84)	1.4±0.6	37.7	38.9
Endocíticos + TGN						
TGN + CD63	2(25)	40 (120)	43 (118)	CD63 2.7±1.3 TGN 1.4±0.5	25.3	28.5
TGN - Endosomas						
CI-M6PR (lumen)	1(24)	47 (145)	55 (155)	1.3±0.5	28.3	31.4
CI-M6PR (c-tail)	2(27)	39 (145)	42 (150)	1.0±0.0	19.5	20.6
CD-M6PR (c-tail)	2(27)	12(112)	13(115)	1.0±0.0	3.3	4.2
CD-M6PR (lumen)	1(24)	10(110)	12(115)	1.0±0.0	4.9	6.2
ACTINA	1(25)	25(115)	27(118)	1.7±0.5	21.8	22.9

Tabla I

Inmuno-marcaje con oro y ME de viriones y cuerpos densos. La marca no específica se testó omitiendo el anticuerpo primario. Las partículas se clasificaron en función de su tamaño a magnificación de 20000x. El número de partículas analizadas se muestra entre paréntesis. El número de partículas de oro asociadas a cada virión o cuerpo denso se cuantificó y se expresa como la media de las medidas y las desviación estándar de las medias. Los porcentajes de viriones o cuerpos densos positivos se calcularon sustrayendo la marca no específica y el número de partículas analizadas se asumió como el 100%.

globulares de proteínas del tegumento que tienen la capacidad de adquirir una envoltura membranosa y de secretarse al medio extracelular pero que no resultan infecciosas. Cuando cuantificamos la proporción de viriones respecto a DBs obtuvimos un ratio ~1:2 aunque cabe decir que algunos DBs pequeños, con un diámetro menor de 200 nm, podrían haber sido clasificados como viriones.

Como control positivo para esta serie de marcajes, utilizamos un anticuerpo contra la glicoproteína de la envoltura viral gH, y contamos que 97 de 137 viriones (**Fig. 13 A**) y 75 de 112 DBs estaban marcados con 7.9 ± 2.6 partículas de oro por virión. Determinamos la especificidad del inmuno-marcaje suprimiendo el anticuerpo primario o bien utilizando como control negativo un anticuerpo contra la glicoproteína D del virus herpes simplex tipo 1, VHS-1, y cuantificamos las partículas marcadas en ambos casos. Al suprimir el anticuerpo primario, 2 de 25 viriones resultaron marcados con una partícula de oro por virión, mientras que la incubación con el anticuerpo anti-gD del VHS-1 marcó 4 de 110 viriones y 5 de 125 DBs con una partícula de oro por virión.

La tinción de las partículas virales con el marcador TGN46 mostró que éste se encontraba incorporado en la envoltura de 50 de 120 viriones y en 36 de 84 DBs, con 1.4 ± 0.6 partículas de oro por virión; por su parte, el marcador CD63 se encontró marcando 77 de 125 viriones y 73 de 110 DBs con 3.1 ± 1.5 partículas de oro por virión (**Fig. 13 B y C**, y **Tabla 1**).

Para estudiar si estos dos marcadores se encontraban juntos en la envoltura viral, llevamos a cabo un doble marcaje secuencial de algunos virus aislados con ambos anticuerpos, anti-CD63 y anti-TGN46 (**Fig. 10 D**). Primero teñimos las partículas virales con el anti-CD63 seguido de una incubación con proteína A (proteína de origen bacteriano que se une a las inmunoglobulinas de los anticuerpos primarios utilizados) conjugada con oro de 10 nm y posteriormente, marcamos las partículas virales con el anti-TGN46 seguido de una incubación con proteína A asociada a oro de 15 nm. El diferente tamaño de las partículas de oro empleadas en esta tinción nos permitió distinguir la presencia de ambos marcadores en las partículas y así, cuantificamos 40 viriones con doble marcaje de 120 y 43 de 118 DBs doblemente marcados con 2.7 ± 1.3 partículas de oro de 10 nm de diámetro por virión para el marcaje con anti-CD63 y 1.4 ± 0.5 partículas de oro de 15 nm de diámetro por virión detectando el marcador TGN46. Estos resultados indican que la envoltura del CMVH contiene ambos marcadores, TGN46 y CD63, de la ruta exocítica y de la ruta endocítica respectivamente.

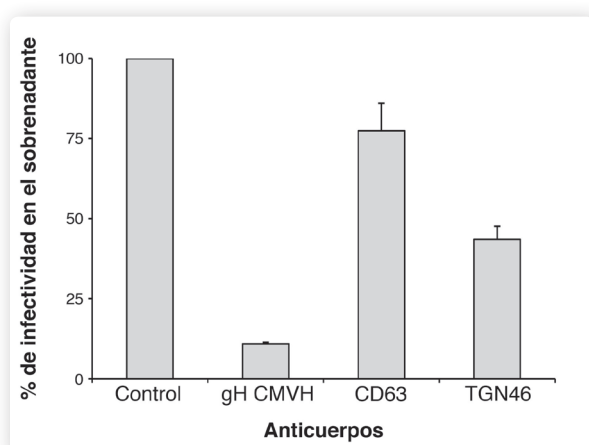


Figura 14

Inmunoprecipitación de partículas virales con anticuerpos anti-TGN46 y anti-CD63.

Los virus secretados al medio extracelular se incubaron con los anticuerpos anti-TGN46, anti-CD63 o bien con los anticuerpos control anti-gD del VHS-1 (control negativo) o anti-gH del CMVH (control positivo). El porcentaje de infectividad fue calculado asignando el 100% de infectividad a las muestras tratadas con el anti-gD. Las barras corresponden a los valores medios de 3 experimentos; las barras de error corresponden a los errores estándar de las medias.



Las proteínas EEAI, HRS y anexina I son proteínas citosólicas que se encuentran unidas a membranas asociadas a los endosomas tempranos. Estos marcadores podrían quedar atrapados en las partículas virales cuando los viriones adquieren su envoltura utilizando cisternas derivadas de estas membranas. Por esta razón, para estudiar la presencia de estas proteínas en la envoltura del CMVH, permeabilizamos las partículas virales con saponina antes de su marcaje con anticuerpos. Como control de la accesibilidad de los anticuerpos a sus epítomos, asociados con la cara interna de la envoltura viral, utilizamos un anticuerpo contra la porción C-terminal de la proteína viral UL33. Las partículas de oro se encontraron exclusivamente asociadas con los viriones permeabilizados, lo que es coherente con la unión del anticuerpo al dominio C-terminal de la proteína UL33 (**Fig. 13 E**), y 64 de 141 viriones y 72 de 151 DBs se encontraron marcados con 1.1 ± 0.3 partículas de oro por virión.

Cuando cuantificamos las partículas marcadas con los anticuerpos anti-EEAI y anti-anexina I encontramos que sólo algunos viriones y DBs estaban marcados con oro, 35 de 115 viriones y 37 de 127 DBs se marcaron con 1.7 ± 0.6 partículas de oro por virión para el anticuerpo anti-EEAI; mientras que utilizando el suero anti-anexina I se marcaron 40 de 108 viriones y 35 de 103 DBs con 2.5 ± 1.1 partículas de oro por virión (**Fig. 13 F-G**). Sin embargo, el anticuerpo anti-HRS marcó muy pocas partículas virales (8 de 128 viriones y 6 de 120 DBs marcados con 1 partícula de oro por virión).

Cuando utilizamos un anticuerpo contra el dominio luminal del marcador TfR, que queda expuesto en la cara externa de la envoltura viral, detectamos un gran número de partículas virales marcadas, 50 de 105 viriones y 52 de 115 DBs se marcaron con 1.9 ± 0.6 partículas de oro por virión (**Fig. 13 H**). Sin embargo, cuando utilizamos un anticuerpo anti-TfR dirigido contra la cola citoplasmática de la proteína, que se encontraría en la cara interna de la envoltura viral si se incorporase a la misma, encontramos muy pocas partículas virales marcadas (18 de 120 viriones y 16 de 122 DBs marcados con 1 partícula de oro por virión), lo que podría ser debido a que la accesibilidad del anticuerpo a su epítomo estuviese impedida.

A continuación, estudiamos si los marcadores M6PRs se incorporan a la membrana viral. Cuando marcamos partículas intactas con envoltura con un suero contra el dominio luminal de la proteína CI-M6PR, encontramos que el oro estaba asociado a la superficie de 47 de 145 viriones y a 55 de 155 DBs con 1.3 ± 0.5 partículas de oro por virión (**Fig. 13 I**). Además, un anticuerpo contra la cola citoplasmática de la proteína CI-M6PR tiñó 39 de 145 viriones permeabilizados y 42 de 150 DBs permeabilizados con 1 partícula de oro por virión, demostrando así la incorporación del marcador CI-M6PR en la envoltura viral. Sin embargo, un anticuerpo contra el dominio luminal de la cola citoplasmática de CD-M6PR marcó muy pocas partículas virales intactas (10 de 110 viriones y 12 de 115 DBs marcados con 1 partícula de oro por virión, respectivamente).

En conjunto, los resultados de estos marcajes indican que tanto los viriones como los DBs adquieren su envoltura final del mismo tipo de membranas, y confirman que tanto marcadores del TGN y de la ruta endocítica y de la ruta de transporte entre el TGN y los endosomas, se incorporan a la envoltura final del CMVH.



I.4 Precipitación de los virus infectivos con anticuerpos contra proteínas celulares.

Nuestras observaciones previas sugieren que el CMVH adquiere su envoltura definitiva de membranas derivadas del TGN y de la ruta endocítica. Para investigar si las partículas virales que adquieren su envoltura de este tipo de membranas son infecciosas, llevamos a cabo un ensayo de precipitación de virus secretados al sobrenadante de las células infectadas. Los anticuerpos que utilizamos están diseñados contra un epítipo del dominio ecto-luminal de las proteínas CD63 y TGN46. El sobrenadante procedente de células BJ1 infectadas con la cepa recombinante RecCMV que expresa la proteína verde fluorescente (“*green fluorescent protein*”, GFP), bajo el control de un promotor temprano del CMVH (McSharry *et al.*, 2001), se mezcló con los anticuerpos correspondientes que posteriormente se adsorbieron en células “Pansorbin”, bacterias que llevan proteína A en su superficie, la cual une eficientemente las inmunoglobulinas de los anticuerpos. A continuación, las muestras se centrifugaron y los virus infectivos presentes en el sobrenadante o no presentes, que no fueron precipitados unidos a los anticuerpos y éstos a las células “Pansorbin”, se titularon en células BJ1 mediante la medida del número de células que expresan la GFP y su análisis por citometría de flujo (Fraile-Ramos *et al.*, 2007). Como control positivo de la precipitación utilizamos un anticuerpo contra la proteína gH del CMVH, que eliminó completamente las partículas virales infectivas del sobrenadante (Fig. 14). Cuando utilizamos un anticuerpo contra la proteína gB del CMVH, observamos una reducción similar en el número de virus infectivos presentes en el sobrenadante (datos no mostrados).

La precipitación inespecífica de virus se determinó utilizando un anticuerpo contra la proteína gD del VHS-I, el cual produjo una pequeña reducción (< 5%) en el número de partículas infecciosas. Como se muestra en la figura 14, los anticuerpos contra CD63 y TGN46 consiguieron precipitar una parte de los virus infecciosos (~50% y ~35% respectivamente).

Contemplando en conjunto todos estos resultados, podemos concluir que las membranas que contienen los marcadores TGN46 y CD63 son la fuente de las envolturas membranosas de las partículas virales infecciosas.



2 Identificación de componentes celulares implicados en las etapas finales de ensamblaje del CMVH

2.1 La infección por el CMVH induce la expresión de la proteína syntaxina 3.

Una vez caracterizada la naturaleza de las membranas celulares que generan la envoltura de los viriones del CMVH, decidimos estudiar qué elementos moleculares están implicados en los procesos que implican la interacción del virus con los sistemas de membranas celulares: la adquisición de la envoltura y la secreción de las partículas virales al medio extracelular. Basándonos en los estudios previos que ya existían acerca de la expresión de los genes celulares durante la infección por el CMVH realizados mediante micro-arrays de expresión de ADNc, observamos que la expresión de algunas proteínas de la familia SNARE, implicadas en los eventos de fusión de membranas celulares, entre ellas, la proteína syntaxina 3, STX3, aumentaba durante la infección por el virus (Paul Kellam y Vincent Emery comunicación personal, Hertel *et al.*, 2004).

Para investigar la posible participación de la STX3 en la morfogénesis viral, analizamos en primer lugar sus niveles de ARNs mensajeros en las células BJI infectadas por el CMVH a distintos tiempos tras la infección (**Fig. 15 A**). El ARN mensajero de la STX3 se detecta desde el día 1 post-infección, aumenta potentemente a día 2 post-infección y continúa aumentando durante el curso de la infección. El análisis mediante WB de las células BJI y de las células humanas del epitelio pigmentado de la retina (datos no mostrados) infectadas por el CMVH, mostró que existe una potente inducción de la expresión de la STX3A (que en adelante denominaremos como STX3) (**Fig. 15 B**), consistente con el incremento en la expresión de los niveles de sus ARNs mensajeros observado previamente.

2.2 La STX3 está localizada en la membrana plasmática y en la zona de ensamblaje viral, y se incorpora a la envoltura del CMVH.

A continuación, investigamos la distribución subcelular de la STX3 mediante microscopía de inmunofluorescencia (IF). Tal y como esperábamos, no detectamos marca en las células BJI sin infectar (**Fig. 15 C**), mientras que en las células infectadas con el CMVH encontramos la STX3 marcando la membrana plasmática así como regiones intracelulares en el lugar de ensamblaje del virus, donde se acumulan la glicoproteína gH, (**Fig. 15 C**) y la proteína del tegumento pp28 del CMVH, (datos no mostrados). Además, cuando examinamos más cuidadosamente las tinciones observamos que una parte de la STX3 se encontraba rodeando ciertas estructuras que contienen a la glicoproteína gH (**Fig. 15 C**).

Para estudiar en detalle la localización subcelular de la STX3, realizamos un inmuno-marcaje con oro en crio-secciones de células BJI infectadas por el CMVH y lo analizamos mediante ME. Debido a que el anticuerpo del que disponemos no nos permitía detectar con la suficiente confianza la STX3 endógena en las crio-secciones, analizamos la distribución de una construcción que lleva fusionado en el extremo C-terminal de la STX3 un marcador c-myc, STX3-c-myc (ver próximos experimentos). Previamente, se ha demostrado que este marcador no interfiere en la distribución de la STX3 endógena (Kreitzer *et al.*, 2003). En nuestra experiencia, cuando marcamos las células infectadas por el CMVH con un anticuerpo contra esta proteína mediante IF, observamos un patrón de tinción similar al de la STX3 endógena (**Fig. 16**).



Resultados

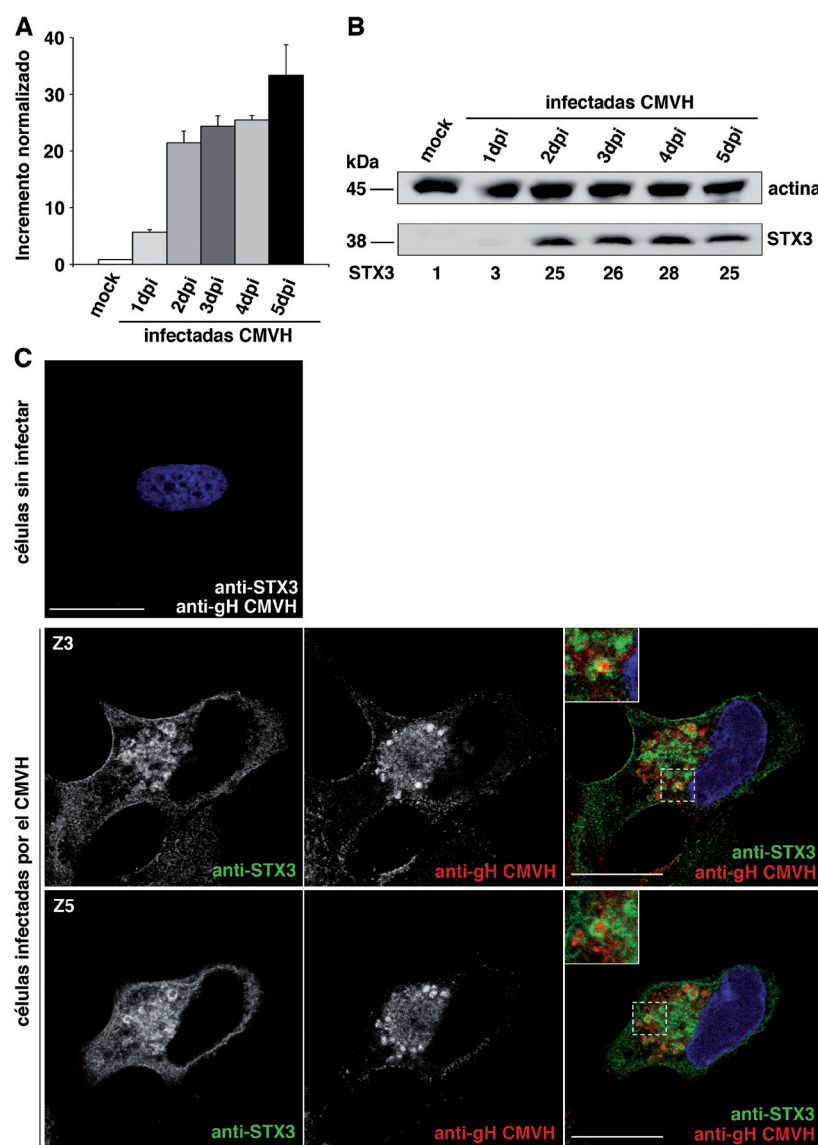


Figura 15

Expresión y localización subcelular de la sintaxina 3 (STX3) en las células infectadas por el CMVH. A.

Regulación transcripcional de la STX3 durante la infección, medida por qRT-PCR y normalizada respecto al ARNr 18S. Los datos corresponden al incremento normalizado de 3 experimentos diferentes con sus errores estándar. B. Expresión de la STX3 durante la infección viral expresada como porcentaje. La cantidad de proteína fue normalizada mediante la detección de la actina. C.

Localización subcelular de la STX3 en las células infectadas por el CMVH. Las imágenes corresponden a la zona basal (Z3) o apical (Z5) de la célula tomadas por microscopía confocal. La STX3 (en verde) se detecta en la membrana plasmática y en la zona de ensamblaje viral, donde se acumula la gH (en rojo). Los núcleos celulares aparecen teñidos en azul con DAPI. Las regiones ampliadas a mayor magnificación se muestran en los recuadros. Escala, 20 μ m.

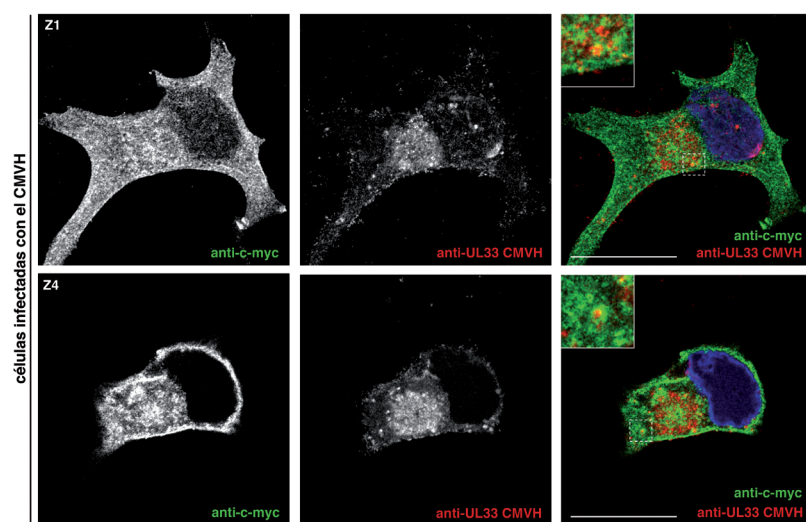


Figura 16

Expresión y localización subcelular de la sintaxina 3 (STX3) exógena en las células infectadas por el CMVH que expresan la construcción STX3-c-myc. La STX3-c-myc (en verde) se detectó con un anticuerpo anti-myc en la membrana plasmática y en la zona de ensamblaje viral, donde se acumula la proteína viral UL33 (en rojo). Los núcleos celulares aparecen teñidos en azul con DAPI. Las regiones ampliadas a mayor magnificación se muestran en los recuadros. Escala, 20 μ m.

La STX3-c-myc (en verde) se detectó con un anticuerpo anti-myc en la membrana plasmática y en la zona de ensamblaje viral, donde se acumula la proteína viral UL33 (en rojo). Los núcleos celulares aparecen teñidos en azul con DAPI. Las regiones ampliadas a mayor magnificación se muestran en los recuadros. Escala, 20 μ m.

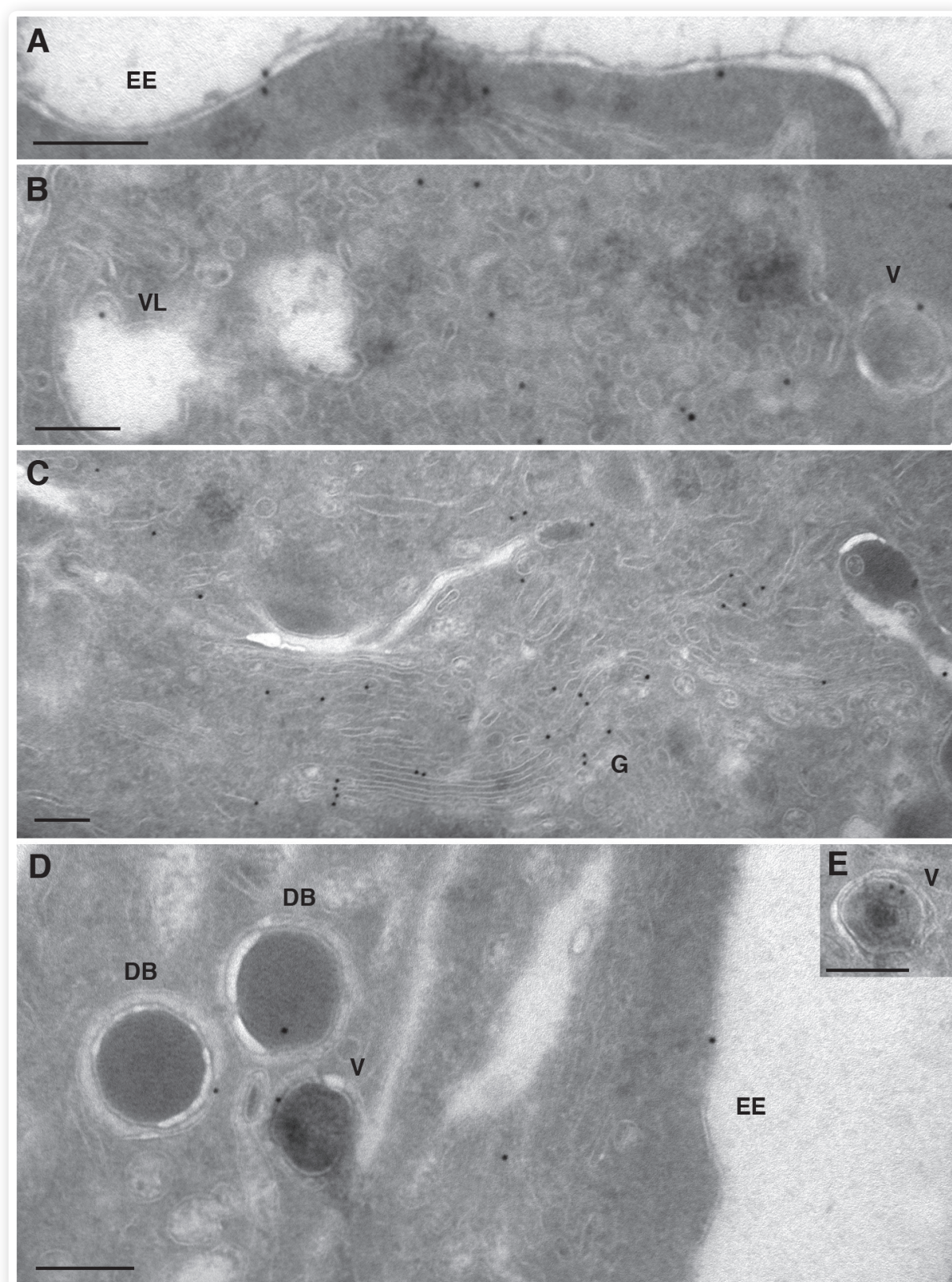


Figura 17

Inmuno-localización de la syntaxina 3 (STX3) exógena mediante microscopía electrónica en las células infectadas por el CMVH que expresan la construcción STX3-c-myc. Las criosecciones de las células infectadas se tiñeron con un anticuerpo anti-c-myc seguido por un anticuerpo conjugado con oro de 12 nm. La STX3-c-myc se localizó en la membrana plasmática (A,D) en vesículas y túbulos (B,C) y en la envoltura de las partículas virales y en la vacuola que las contiene (D,E). EE: espacio extracelular; VL: vacuola; G: aparato de Golgi; V: virión, DB: cuerpo denso. Escala, 200 nm.



En las crio-secciones de células infectadas, observamos marcaje con oro en la membrana plasmática (**Fig. 17 A y D**) y en el lugar de ensamblaje viral, asociado al lumen de vesículas pequeñas de ~24 nm de diámetro (**Fig. 17 B**) y en cisternas muy similares a las del aparato de Golgi (**Fig. 17 C**). El punto más interesante a destacar es que detectamos la STX3 marcando las envolturas de virus y de DBs (**Fig. 17 D-E**) y, ocasionalmente, la vacuola que los contiene.

Como ya hicimos anteriormente para los marcadores celulares de las rutas endocítica y exocítica, estudiamos la posible presencia de la STX3 en las envolturas virales mediante el análisis por inmunomicroscopía electrónica de virus aislados. Para poder tener acceso al epítipo que reconoce al anticuerpo anti-STX3, localizado en la cara interna de la envoltura viral, permeabilizamos con saponina los virus secretados por células BJ1 infectadas por el CMVH. Como control de la accesibilidad del anticuerpo, utilizamos un suero contra la proteína del tegumento viral pp28 y encontramos que 95 de 125 viriones estaban marcados con 3.1 ± 1.2 partículas de oro por virión; mientras que la especificidad del marcaje la determinamos con un anticuerpo contra la glicoproteína D, del VHS-I (4 de 105 viriones se marcaron con 1 partícula de oro), o bien omitiendo el anticuerpo primario (solamente 1 de 24 viriones se marcaron con 1 partícula de oro). Cuando marcamos las partículas virales con el anticuerpo anti-STX3, detectamos marcaje con oro en 76 de 160 viriones, con 1.5 ± 0.3 partículas de oro por virión (**Fig. 18 A**).

Los virus secretados por células BJ1 que expresan la construcción STX3-c-myc que fueron infectadas por el CMVH se mantuvieron intactos y se incubaron con un anticuerpo anti-c-myc, ya que el marcador myc C-terminal queda expuesto en la cara externa de la envoltura viral. En este caso, encontramos marcados con oro 67 de 165 viriones, con 2.5 ± 0.5 partículas de oro por virión (**Fig. 18 B**).

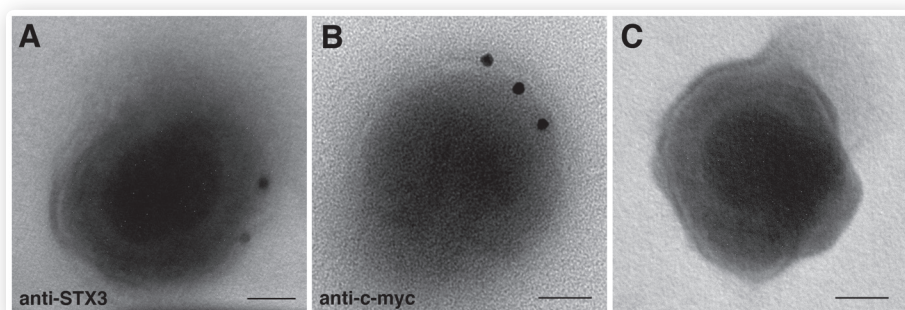


Figura 18

Inmuno-localización de la sintaxina 3 (STX3) mediante microscopía electrónica en las envolturas de los viriones aislados. Los virus secretados por células parentales o que expresaban la construcción STX3-c-myc se permeabilizaron con saponina (A) o se marcaron directamente (B) con los anticuerpos anti-STX3 (A) o anti-c-myc (B) y con la proteína A acoplada a oro. C. Estructura general de los viriones donde la núcleo-cápsida es revelada por el acetato de uranilo. Escala, 50 nm.

2.3 El silenciamiento de la STX3 en células infectadas por el CMVH causa una disminución en la producción total de virus, pero no afecta a la producción del VHS-I.

Tras encontrar evidencias de que la STX3 se incorpora a las envolturas de los viriones del CMVH, decidimos investigar la posible participación de la STX3 en el ciclo de vida del virus. Para ello, silenciamos su expresión en las células BJI mediante la tecnología de los ARNs interferentes (ARNi) utilizando ARNs ahorquillados cortos (*“short-hairpin RNAs”,* shRNAs). Las células BJI expresan niveles indetectables de STX3, por lo que evaluamos la eficiencia de silenciamiento de los shRNAs en una línea celular humana derivada de un melanoma (células MeWo), que expresan niveles altos de STX3 intracelular. Analizamos la eficiencia de los shRNAs mediante IF y WB y comprobamos que dos de los cuatro shRNAs de los que disponíamos (anti-STX3 #304 y anti-STX3 #424) silenciaban potentemente la expresión de la STX3 (**Fig. 19**); por ello, usamos éstos en nuestros experimentos.

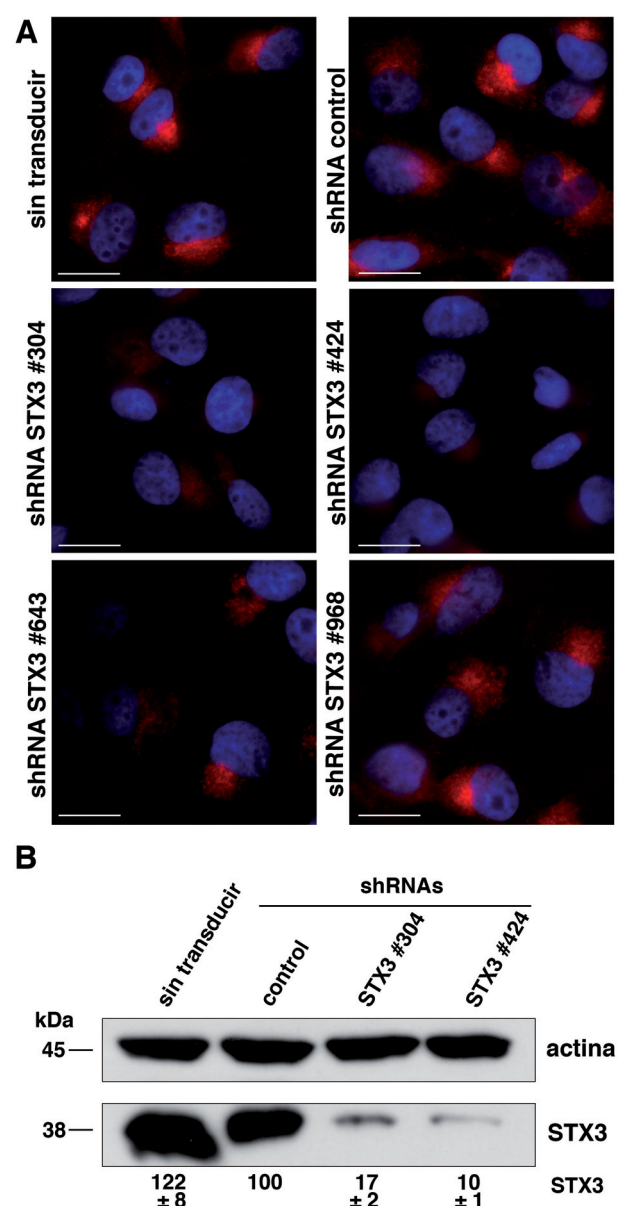


Figura 19

Expresión de la syntaxina 3 (STX3) en las células MeWo que expresan los shRNAs anti-STX3. La eficiencia de silenciamiento de la STX3 de los shRNAs se testó mediante immuno-fluorescencia (A) y WB (B) con un anticuerpo anti-STX3. Los núcleos celulares aparecen teñidos en azul con DAPI. Escala, 20 μ m. Los niveles de STX3 se expresan en forma de porcentaje, normalizado respecto a la expresión de la actina.

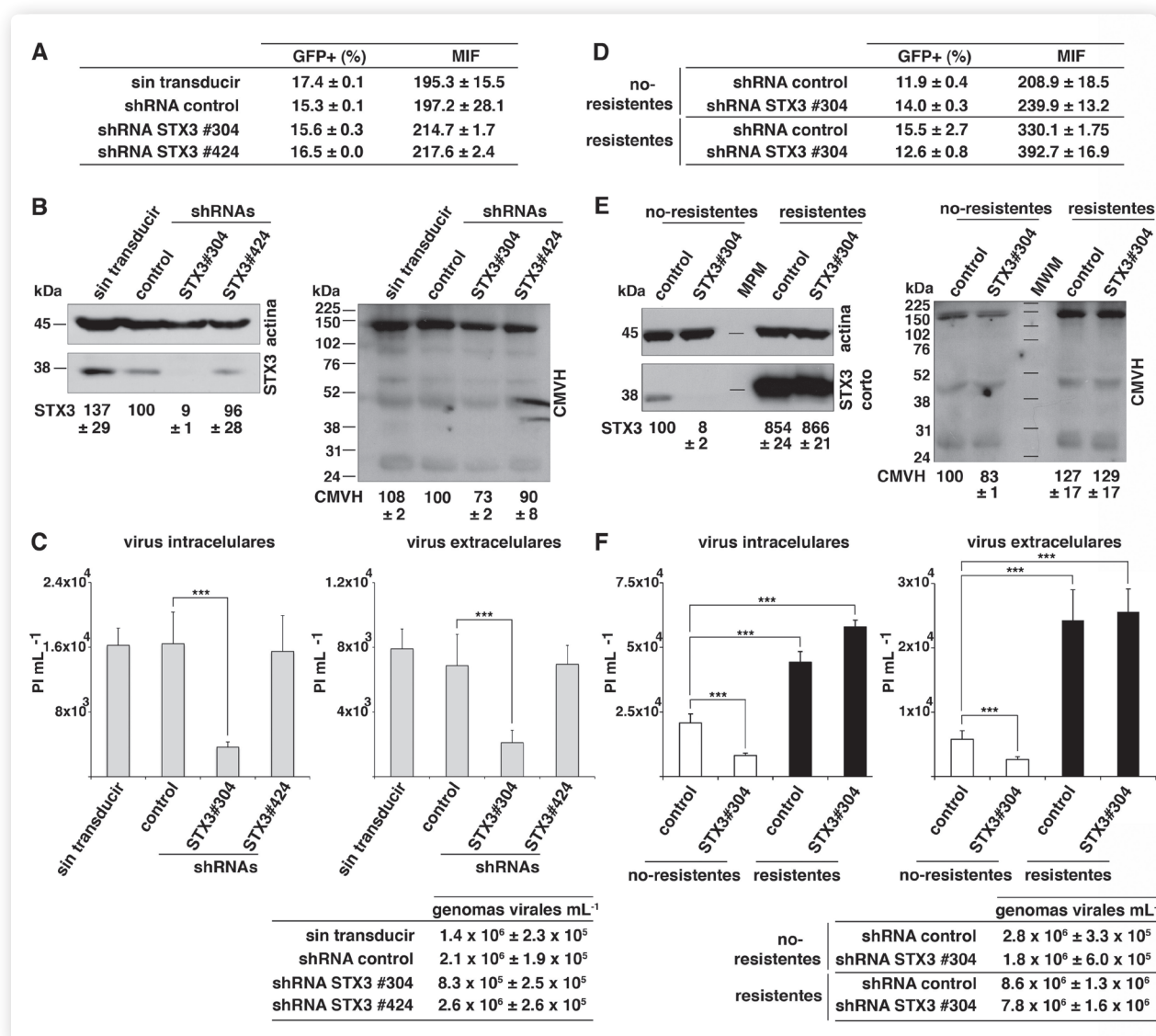


Figura 20

Ensayos funcionales de producción del CMVH mediante el silenciamiento de la syntaxina 3 (STX3).

A-C. Las células sin transducir o transducidas con los shRNAs control o STX3, se infectaron con la cepa viral RecCMV. A los 3 días tras la infección, el número de células infectadas se analizó mediante citometría de flujo (A). A los 4 días tras la infección, se examinó la expresión de la STX3 mediante WB (B) y a los 5 días, se recogieron los sobrenadantes y las células, y el número de virus se determinó mediante su titulación en células frescas y posterior análisis de la expresión de la GFP. El número de genomas virales en los sobrenadantes se determinó mediante qRT-PCR. Los datos se expresan como medias de 3 experimentos más su error estándar. D-F. Las células que expresaban un vector vacío (células no resistentes) o que expresan la construcción STX3-c-myc (células resistentes) se infectaron con la cepa viral RecCMV y se procesaron como en el ensayo anterior. D. Porcentaje de células que expresan la GFP a día 3 tras la infección, E. WB de la STX3 y proteínas virales a día 4 tras la infección, F. Producción viral extracelular o asociada a las células, y genomas virales secretados a los sobrenadante a día 5 post-infección. ***, $P < 0.001$. MIF: media de la intensidad de la fluorescencia, PI: partículas infecciosas.



Las células BJI sin transducir y las células que fueron transducidas con un shRNA control irrelevante o con los shRNAs anti-STX3, se infectaron con la cepa recombinante RecCMV, que expresa la GFP. A día 3 post-infección, analizamos mediante citometría de flujo el número de células BJI que expresan la GFP y la intensidad media de la fluorescencia y no encontramos diferencias significativas entre los distintos cultivos, lo que indica que la STX3 no está implicada en la entrada de los virus a la célula ni en la expresión de proteínas virales tempranas (**Fig. 20 A**). Tras 4 días post-infección, el análisis mediante WB mostró que los shRNAs anti-STX3# 304 causaron una fuerte reducción en los niveles de expresión de la STX3 y un ligero descenso en los niveles de expresión de las proteínas virales, en comparación con los niveles de expresión en las células que fueron transducidas con el shRNAs control (**Fig. 20 B**). Este resultado indica que el silenciamiento de la STX3 podría influir sobre los niveles de expresión de las proteínas virales.

Cuando analizamos el número de virus infectivos tanto intracelulares como extracelulares 5 días tras la infección, detectamos un descenso significativo de ~ 4 veces en la producción viral total en las células donde silenciamos la expresión de la STX3 (**Fig. 20 C**). Para distinguir si el silenciamiento de la STX3 induce un descenso del número físico de partículas virales o bien si afecta a la capacidad infectiva de los virus, determinamos la carga viral en el sobrenadante mediante qRT-PCR ("*quantitative RT-PCR*", qRT-PCR) (**Fig. 20 C**) y encontramos que existía un descenso de ~ 2.5 veces en el número de genomas virales en los sobrenadantes procedentes de células donde la STX3 está silenciada respecto a los procedentes de las células control.

Para determinar la especificidad del efecto del silenciamiento de la STX3 en la producción del CMVH, llevamos a cabo experimentos de rescate de la función de la STX3 utilizando una construcción recombinante que es resistente a la inhibición por los shRNAs y que lleva como marcador c-myc, STX3-c-myc. Las células BJI que expresaban un vector vacío (células no resistentes) o bien las células BJI que expresaban la construcción STX3-c-myc resistente a la acción de los shRNAs (células resistentes), fueron transducidas con el shRNA control o con los shRNAs anti-STX3, e infectadas con el RecCMV. A los 3 días tras la infección, no encontramos diferencias en el número de células que expresaban GFP, sin embargo, la media de la intensidad de fluorescencia (MIF) era ligeramente más alta en las células resistentes (**Fig. 20 D**), lo que sugiere que la expresión de la STX3 exógena podría afectar a la expresión de genes virales tempranos. El análisis mediante WB realizado 4 días post-infección reveló que existía una intensa disminución en los niveles de expresión de la STX3 en las células no resistentes que fueron transducidas con los shRNAs anti-STX3, mientras que en las células resistentes a los shRNAs anti-STX3, los niveles de la proteína STX3-c-myc exógena eran ~ 8 veces más altos que el nivel de expresión que induce la infección por el CMVH (**Fig. 20 E**). La expresión de las proteínas virales estaba ligeramente aumentada en las líneas celulares resistentes a los shRNAs (**Fig. 20 E**), lo que apunta hacia la posibilidad de que la expresión de la STX3 exógena pudiera afectar a la expresión de las proteínas del CMVH.

Cuando cuantificamos el número de virus infectivos tanto intracelulares como extracelulares a día 5 post-infección, observamos una disminución significativa de ~ 2.5 veces en la producción viral total en las células no resistentes a los shRNAs donde la STX3 se encontraba silenciada (**Fig. 20 F**), mientras que en las células resistentes, la producción viral no solo se recuperaba sino que se encontraba aumentada ~ 4



veces (**Fig. 20 F**). El análisis de los genomas virales presentes en los sobrenadantes, reveló un aumento de ~3 veces en el número de partículas secretadas por las células resistentes a la acción de los shRNAs comparado con el número de genomas presentes en los sobrenadantes de las células no resistentes transducidas con el shRNA control (**Fig. 20 F**).

Una vez confirmado que existe un efecto a nivel funcional en la producción total de virus cuando se silencia la STX3 en células infectadas por el CMVH, nos preguntamos si este efecto es específico para el CMVH o si podría repetirse también para otros herpes-virus. Para responder a esta pregunta, estudiamos si el silenciamiento de la STX3 afectaba a la producción de un α -herpes-virus, el virus herpes simplex tipo-I (VHS-I), utilizando células MeWo que permiten la replicación del VHS-I.

Las células MeWo sin transducir y las que fueron transducidas con los shRNAs anti-STX3, se infectaron con el VHS-I. A las 24 horas tras la infección, la expresión de la STX3 y de la glicoproteína gG, del VHS-I se analizó mediante WB (**Fig. 21 A**). Cuando examinamos el resultado, detectamos una fuerte inhibición en la expresión de la STX3 en las células que expresaban los shRNAs anti-STX3, mientras que los niveles de la gG del VHS-I se mantenían similares entre los cultivos, mostrando que el silenciamiento de la STX3 no afecta a la entrada de los virus en las células ni a la expresión de las proteínas virales.

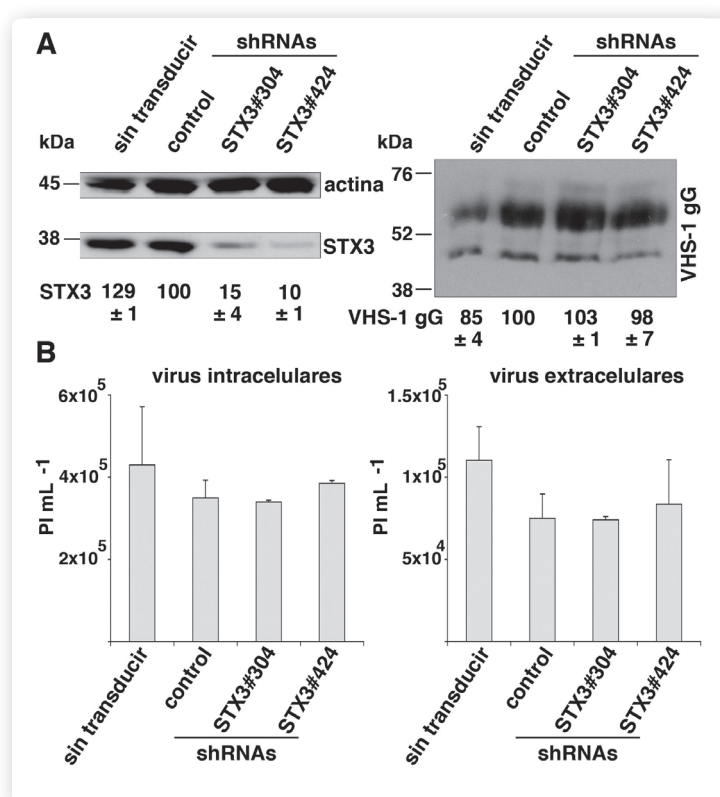


Figura 21

Ensayos funcionales de producción del VHS-I mediante el silenciamiento de la syntaxina 3 (STX3).

A Las células MeWo sin transducir o transducidas con los shRNAs control o STX3, se infectaron con el VHS-I. A las 24h tras la infección, se analizó la expresión de la STX3 y la glicoproteína viral gG mediante WB con anticuerpos anti-STX3, anti-gG y anti-actina. Se muestran el porcentaje de STX3 normalizado frente a la cantidad de actina. B El número de virus en los sobrenadantes y las células se determinó mediante su titulación en células Vero. Los datos se expresan como medias de 3 experimentos más su error estándar. PI: partículas infecciosas.



Cuando analizamos la producción viral, obtuvimos un número similar de virus en todos los cultivos, tanto a nivel intracelular como extracelular (**Fig. 21 B**). Estos resultados indican que el silenciamiento de la STX3 no tiene ningún impacto en la producción del VHS-I, posiblemente debido a las diferencias que existen en la morfogénesis del VHS-I y del CMVH. Además, este resultado confirma que el efecto de los shRNAs anti-STX3 sobre la producción viral del CMVH es específico.

2.4 El análisis ultra-estructural de monocapas de células infectadas con el CMVH y silenciadas para la STX3, revela alteraciones en la morfogénesis viral.

Para discriminar en qué etapa de la morfogénesis viral participa la proteína SNARE STX3, llevamos a cabo un estudio a nivel ultraestructural mediante ME. Para ello, examinamos cortes seriados de monocapas de células infectadas por el CMVH y embebidas “*in situ*” en epoxi-resina, una aproximación que permite la localización directa del lugar de ensamblaje viral tal y como se ha descrito previamente (Fontana *et al.*, 2008). En un primer examen del sitio de ensamblaje, no detectamos diferencias dramáticas entre las células que expresan el shRNA control y las células silenciadas para la STX3, con la excepción de la aparente presencia de más DBs en las células silenciadas respecto a las control (**Fig. 22 B-C**). Para poder estudiar con mayor profundidad las posibles diferencias entre los cultivos, reconstruimos las zonas de ensamblaje viral de al menos 5 células control y de 5 células silenciadas, y cuantificamos el número de partículas virales y de DBs en el proceso de adquisición de la envoltura y completamente envueltos. Cuando completamos nuestra cuantificación, confirmamos lo que habíamos observado a primera vista, que el silenciamiento de la STX3 aumentaba el número de DBs (~ 0.18 DBs/ μm^3 en las células silenciadas comparado con ~ 0.05 DBs/ μm^3 en las células control; **Tabla 2**), y lo que es más interesante, observamos que comparado con el número de viriones y DBs completamente envueltos, el número de estas estructuras en el proceso de envolvimiento estaba aumentado en las células silenciadas para la STX3 (**Tabla 2**), lo que sugiere que la STX3 podría afectar el proceso de envolvimiento del virus.

2.5 El silenciamiento de la STX3 reduce la expresión de los marcadores de MVBs/lisosomas.

Para desentrañar los mecanismos que subyacen a la participación de la STX3 en la morfogénesis del CMVH y para obtener indicios sobre en qué procesos de fusión de vesículas está participando la proteína STX3 en las células BJ1, analizamos mediante IF la expresión y la distribución de varios marcadores celulares en las células MeWo silenciadas para la STX3. Estos marcadores, que ya habíamos descrito incorporados a las envolturas virales (ver sección 1.3) (Cepeda *et al.*, 2010), son: el marcador de la red de vesículas del *trans*-Golgi, TGN46, el marcador de MVBs/lisosomas, CD63, el marcador de endosomas de reciclaje, TfR y los dos receptores de la manosa 6-fosfato que se transportan entre el *trans*-Golgi y los endosomas, CI-M6PR y CD-M6PR. El análisis por IF mostró que no existía un efecto notable en la expresión de los marcadores, excepto para CD63 en las células silenciadas (**Fig. 23 A**). Este resultado se confirmó mediante inmuno-marcaje de CD63 en la superficie celular analizado por citometría de flujo (**Fig. 23 B**). Además, cuando analizamos la expresión de este marcador mediante WB encontramos una reducción de ~ 4 veces en los niveles de CD63 en las células silenciadas (**Fig. 23 C**) y la vida media del CD63 en las células silenciadas respecto a las células parentales, calculada mediante ensayos de pulso y caza seguidos de inmunoprecipitación resultó menor en las primeras (~ 13 h de vida media en las células silenciadas para la STX3 y ~ 26 h de vida media en las células control) (**Fig. 23 D**).



Resultados

	Virus envolviéndose / μm^3	Virus envueltos / μm^3	DBs envolviéndose / μm^3	DBs envueltos / μm^3
shRNA control	0.04 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01
shRNA anti-STX3	0.06 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01	0.14 \pm 0.07	0.04 \pm 0.02

Tabla 2

Cuantificación de las partículas virales en el lugar de ensamblaje reconstruido en las monocapas de las células control o silenciadas para la STX3 infectadas con el CMVH. Las células control o silenciadas para la STX3 se infectaron con la cepa RecCMV. A los 5 días tras la infección, las monocapas de células se incluyeron “*in situ*” en epoxi-resina y se tomaron secciones consecutivas cada 0.5 μm y se analizaron mediante ME. El lugar de ensamblaje completo se reconstruyó para al menos 5 células de cada cultivo tomando ~40 micrografías a 30000x de magnificación. Los viriones y los cuerpos densos, DBs, envolviéndose o completamente envueltos se cuantificaron. Los datos presentados corresponden a la media de 5 células más la desviación estándar de la media. El factor de normalización fue el volumen celular.

A continuación examinamos la expresión de CD63 en las células BJI infectadas por el CMVH y encontramos que había ~2 veces menos CD63 en las células silenciadas para la STX3 (**Fig. 23 D**). Es interesante destacar que cuando analizamos los niveles de CD63 en las células BJI que expresan la construcción STX3-c-myc resistente a la acción de los shRNAs, detectamos un aumento de ~2 veces en los niveles de CD63, tanto en las células no infectadas como en las infectadas por el CMVH (**Fig. 23 E**).

Aunque previamente habíamos mostrado que las proteínas de la membrana lisosomal Lamp1 y Lamp2 estaban excluidas del lugar de ensamblaje viral (**Fig. 8**) (Cepeda *et al.*, 2010), analizamos su expresión y distribución en las células MeWo silenciadas para la STX3 para distinguir si el silenciamiento de la STX3 afectaba de forma específica al marcador CD63 o si bien tenía un efecto más general sobre la ruta de los MVBs/lisosomas. Como se observó para CD63, los análisis de IF y WB mostraron una reducción en la expresión de LAMP1 (**Fig.23 A,C**) y LAMP2 (datos no mostrados) en las células silenciadas. Estos resultados indican que la STX3 afecta a la expresión de las glicoproteínas de membrana lisosomales CD63, Lamp1 y Lamp2, y sugiere una participación general de esta proteína SNARE en las rutas de transporte y/o en la biogénesis de los MVBs/lisosomas.

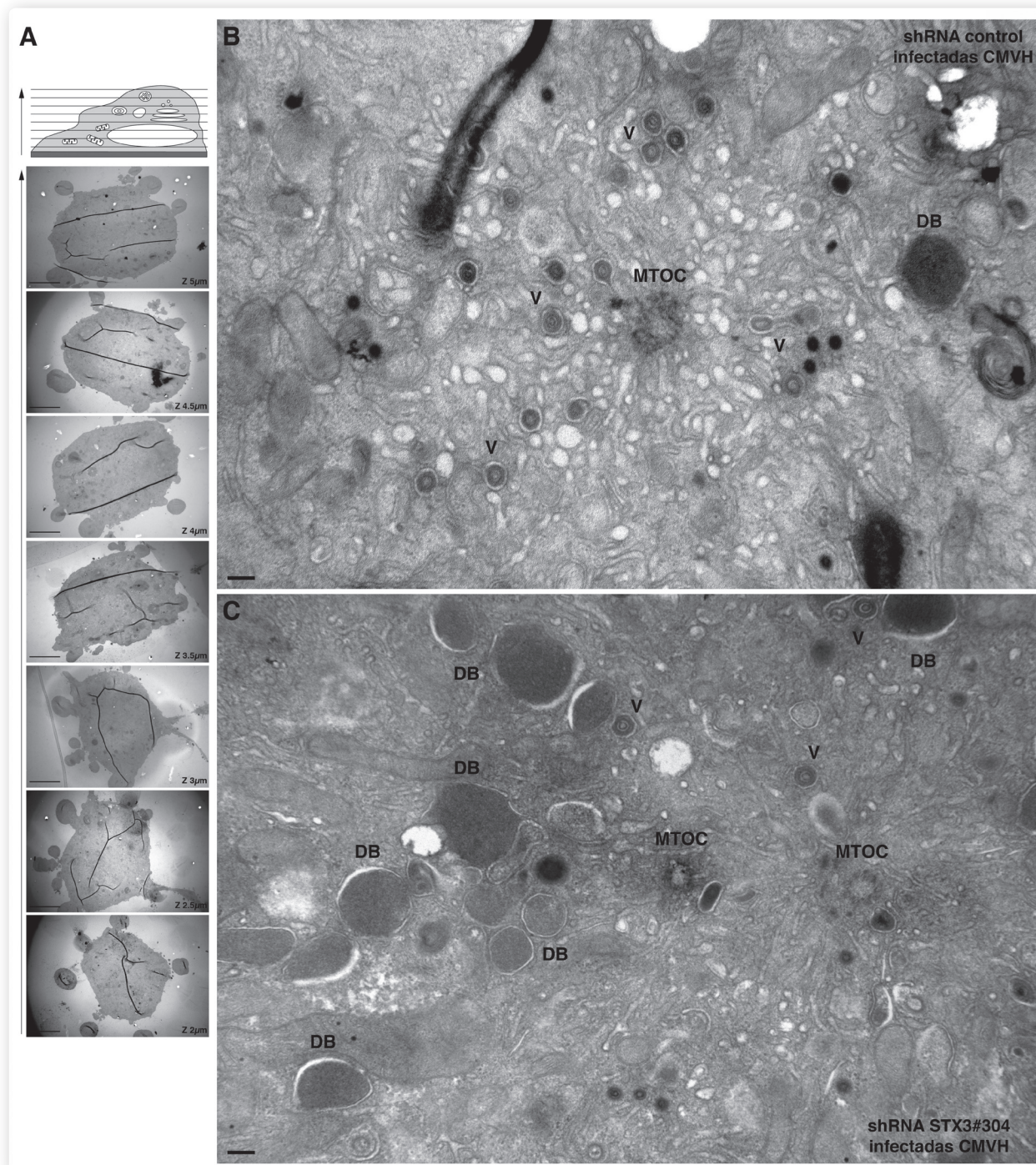


Figura 22

Análisis de monocapas de células infectadas por el CMVH que expresan los shRNAs control o anti-STX3 incluidas “in situ”. Las células control o silenciadas para la STX3 se infectaron con la cepa RecCMV.A los 5 días tras la infección, las monocapas de células se incluyeron “in situ” en epoxi-resina. A. Modelo de cortes paralelos a la base de la célula. Micrografías de secciones seriadas de una célula de 2 a 5 μm , presentadas a baja magnificación. Escala, 5 μm . B-C. Micrografías a alta magnificación de la zona de ensamblaje viral de células control (B) y silenciadas para la STX3 (C). MTOC: “microtubule-organising centre”, V: virión, DB: cuerpo denso. Escala, 200 nm.



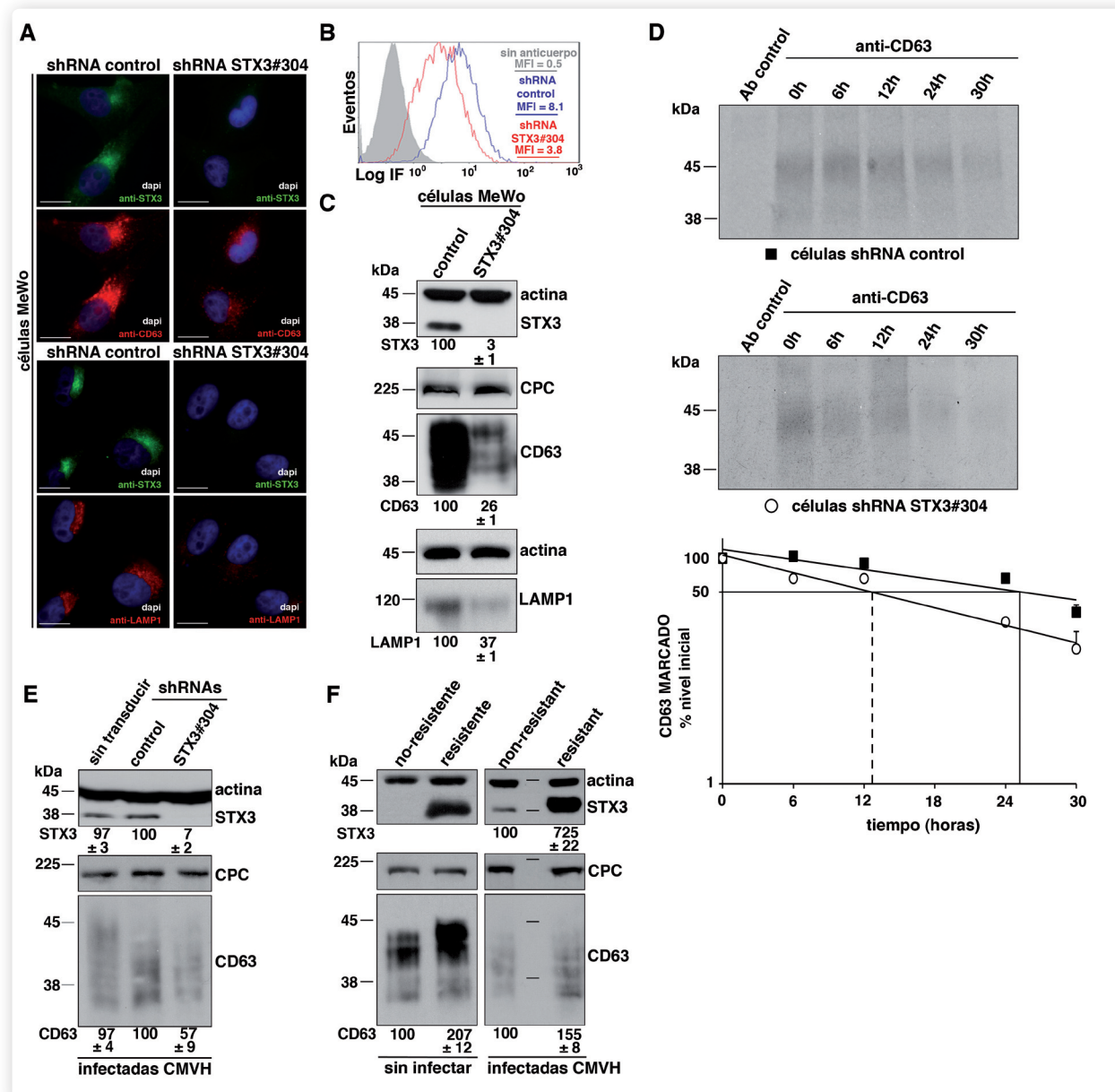


Figura 23

Expresión de marcadores de MVBs/lisosomas en células que expresan los shRNAs control o anti-STX3 en células parentales o que expresaban la construcción STX3-c-myc. A-D. Expresión de CD63 y Lamp1 en células MeWo transducidas con los shRNAs control o anti-STX3. A. Inmuno-marcaje y análisis por microscopía de fluorescencia en células parentales y silenciadas para la STX3 con los anti-CD63 (rojo) o anti-Lamp1 (rojo). Tinción de los núcleos celulares en azul por DAPI. Escala, 20 μ m. B. Marcaje de CD63 en la superficie celular y análisis por citometría de flujo. C. Análisis de la expresión de CD63 y Lamp1 mediante WB se muestran. Los porcentajes de STX3, CD63 y Lamp1 normalizados respecto a la actina o la cadena pesada de la clatrina, se muestran pertenecientes a 3 experimentos distintos. D. Análisis de pulso y caza de la vida media de CD63. Las células MeWo parentales (cuadrados negros) o silenciadas (círculos blancos) se marcaron con metionina- $[^{35}\text{S}]$ durante 16h, se incubaron en medio con exceso de metionina sin marca a los tiempos indicados y los lisados celulares se immuno-precipitaron con un anti-CD63 o un anticuerpo irrelevante. Los niveles de proteína se expresaron como porcentaje de la proteína restante a los distintos tiempos, siendo el 100% la cantidad de proteína a tiempo 0. Los datos son medias de 2 experimentos con sus errores estándar. E. Expresión de CD63 en células sin transducir o transducidas con los shRNAs control o anti-STX3 e infectadas con el RecCMV. F. Expresión de CD63 en células no resistentes o resistentes a la acción de los shRNAs se mantuvieron sin infectar o se infectaron con la cepa RecCMV y se procesaron como en el caso anterior.



discusión







Los virus son organismos que contienen una cantidad limitada de material genético y por ello necesitan parasitar las células y utilizar los orgánulos y componentes celulares para generar su progenie. Los virus con envoltura, como el citomegalovirus humano (CMVH), interaccionan necesariamente con los sistemas de membranas celulares en varias de las etapas de su ciclo vital, especialmente en las etapas finales de la adquisición de la envoltura final y la secreción al medio extracelular. En el caso del CMVH y otros virus, las etapas finales de la morfogénesis ocurren en una estructura intracelular altamente especializada, donde se ensambla la progenie viral y se generan partículas virales maduras e infectivas, denominada lugar de ensamblaje viral. Esta estructura se sitúa en la región perinuclear de la célula y concentra una gran cantidad de componentes virales y celulares así como vesículas, túbulos y cisternas membranosas.

La zona de ensamblaje viral del CMVH se ha caracterizado mediante técnicas de microscopía, sin embargo, a nivel estructural y molecular sigue siendo desconocida. Hasta la fecha, se han descrito algunas proteínas virales asociadas a la zona de ensamblaje como las proteínas virales del tegumento pp28, pp150 y pp71 (Silva *et al.*, 2003, AuCoin *et al.*, 2006, Bresnahan *et al.*, 2000), las glicoproteínas de la envoltura gM y gN (Krzyzaniak *et al.*, 2007) y proteínas no estructurales (Margulies *et al.*, 1996, Fraile-Ramos *et al.*, 2002, Crump *et al.*, 2003, Homman-Loudiyi *et al.*, 2003, Prichard *et al.*, 2005, Seo *et al.*, 2006, Das *et al.*, 2007). También se ha conseguido identificar en el área de ensamblaje algunas proteínas celulares pertenecientes a diferentes rutas de tráfico celular. Se ha propuesto que los α -herpes-virus, como el virus herpes-simplex (VHS), y los β -herpes-virus, como el CMVH, adquieren la envoltura de vesículas de la red del trans-Golgi (“trans-Golgi-network”, TGN), (Mettenleiter *et al.*, 2009, Sanchez *et al.*, 2000a, Homman-Loudiyi *et al.*, 2003), aunque estos estudios muestran solamente una co-localización parcial del lugar de ensamblaje del CMVH con marcadores del TGN. Por otro lado, se ha propuesto que el CMVH adquiere su envoltura en membranas derivadas de los endosomas. Varios componentes de la ruta endocítica, como el marcador de cuerpos multivesiculares (“multi-vesicular bodies”, MVBs)/lisosomas CD63, el cual se ha encontrado incorporado en la envoltura viral (Fraile-Ramos *et al.*, 2002), el marcador del antígeno-I de los endosomas tempranos, (“early endosome antigen-1”, EEA1) y el marcador de endosomas de reciclaje, receptor de la transferrina (“transferrin receptor”, TfR) (Krzyzaniak *et al.*, 2009) se han localizado en el lugar de ensamblaje. También se han descrito asociados al lugar de ensamblaje componentes del transporte mediado por vesículas como son la proteína de la ruta exocítica Bicaudal D1 (Indran *et al.*, 2010), la pequeña GTPasa Rab11, uno de sus efectores FIP4 (Krzyzaniak *et al.*, 2009), la pequeña GTPasa Rab27a (Fraile-Ramos *et al.*, 2010), la chaperona del retículo endoplásmico BiP (Buchkovich *et al.*, 2009), las pequeñas GTPasas Rab3 y Rab5 (Homman-Loudiyi *et al.*, 2003).

Recientemente, se ha descrito que el virus utiliza múltiples rutas paralelas de tráfico celular para transportar al área de ensamblaje las proteínas virales necesarias para la morfogénesis viral (Moorman *et al.*, 2010), y que estas rutas celulares convergen en el lugar de ensamblaje a tiempos tardíos de la infección. Sin embargo, la caracterización completa del lugar de ensamblaje resulta una tarea complicada debido al alto número de componentes implicados y a que la infección por el CMVH produce profundos cambios morfológicos y de expresión de proteínas en las células infectadas.

Aunque la morfogénesis de los herpes-virus ha sido objeto de intensa investigación, quedan todavía importantes cuestiones por resolver. La identificación del lugar de ensamblaje del virus es importante porque éste determina qué proteínas celulares se incorporan en las envolturas de los viriones, lo que puede tener implicaciones relevantes en la patogénesis viral. En este sentido, el virus con envoltura más





Discusión

estudiado ha sido el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), donde se ha visto que muchas proteínas celulares asociadas a membranas se incorporan en la envoltura, entre ellas, moléculas de clase I y de clase II del complejo de histocompatibilidad (“major histocompatibility complex”, MHC), proteínas de adhesión celular como ICAM-I (Cantin *et al.*, 2005). También se han detectado en la envoltura del VIH y de herpesvirus como el VHS-I y el CMVH, moléculas asociadas a las denominadas balsas de lípidos (“lipid rafts”, zonas de la membrana plasmática ricas en esfingolípidos, colesterol y glicerofosfolípidos) como las proteínas de control del complemento CD55 y CD59. La incorporación de estas proteínas en las envolturas virales protege a los virus la lisis mediada por el complemento (Spear *et al.*, 1995).

Los datos existentes acerca de la naturaleza de la envoltura final del CMVH provienen de estudios llevados a cabo en diferentes tipos celulares y utilizando distintos marcadores celulares. En nuestro proyecto de tesis doctoral nos propusimos encontrar una respuesta a esta cuestión y para ello, utilizamos una batería de marcadores celulares que cubren la ruta exocítica, la ruta endocítica y la ruta de transporte entre el TGN y los endosomas, y aplicamos diversas metodologías, tanto morfológicas como bioquímicas.

Un abordaje muy interesante para investigar las interacciones patógeno-hospedador es estudiar los cambios en los niveles de ARNs mensajeros en la célula mediante el análisis de “microarrays”. Esta tecnología se ha aplicado recientemente al estudio de la infección del CMVH y ha revelado una serie de genes celulares que están modulados durante la infección viral aunque la función de la mayoría de estos genes en el ciclo replicativo viral está por determinar (Paul Kellam y Vincent Emery comunicación personal, Zhu *et al.*, 1998, Browne *et al.*, 2001, Hertel *et al.*, 2004, Stanton *et al.*, 2007). Entre ellos, hay genes que codifican para proteínas relacionadas con el transporte mediado por vesículas como son las proteínas SNARE, las pequeñas GTPasas Rab y sus efectores. Es muy probable que el virus, en su interacción con las membranas celulares, utilice y manipule estos componentes celulares para replicarse en las células infectadas. De hecho, estudios funcionales ya han puesto de manifiesto el impacto del silenciamiento de algunas de estas proteínas en la producción viral, como es el caso de Rab27a (Fraile-Ramos *et al.*, 2010) y de Rab11 y uno de sus efectores, la familia de la proteína de interacción 4 (“family of interacting protein 4”, FIP4) (Krzyzaniak *et al.*, 2009).

En este sentido, en este trabajo exploramos la posible relación entre el CMVH y componentes celulares implicados en el transporte mediado por vesículas analizando el papel de la proteína SNARE syntaxina 3 (STX3) en la producción viral y el proceso de envolvimiento del CMVH.

En primer lugar llevamos a cabo estudios de inmunofluorescencia (IF) en las células infectadas por el CMVH utilizando marcadores de los distintos compartimentos de la ruta exocítica como la gigantina y el TGN, de la ruta endocítica como el EEA1, la anexina I, y el HRS para los endosomas tempranos, el TfR para los endosomas de reciclaje, el CD63, Lamp1 y el Lamp2 para los MVBs/lisosomas y de la ruta de transporte entre el TGN y los endosomas como los M6PRs, CD-M6PR y CI-M6PR, y observamos que el virus induce cambios significativos en las rutas de transporte celulares. Muchos de estos marcadores se reclutan al lugar de ensamblaje viral mientras que otros permanecen excluidos. El marcador del aparato de Golgi gigantina se localizó rodeando la zona de ensamblaje (Fig 6) tal y como se había descrito anteriormente (Severi *et al.*, 1988, Sanchez *et al.*, 2000a, Seo *et al.*, 2006, Das *et al.*, 2007). Por el contrario, el marcador TGN46 se recluta al área de ensamblaje donde también se acumula la glicoproteína gH del CMVH, lo que resulta consistente con los resultados obtenidos en estudios precedentes (Sanchez *et al.*, 2000b, Homman-Loudiyi *et al.*, 2003,





Seo *et al.*, 2006, Das *et al.*, 2007). Por su parte, el marcador de endosomas tempranos HRS y los M6PRs se encuentran en la zona perinuclear de las células sin infectar y se mantienen en esta región en las células infectadas (**Fig. 9**). Sin embargo, algunos marcadores de endosomas tempranos como el EEA1 y la anexina I, el marcador de endosomas de reciclaje TfR y el marcador de MVBs, CD63, que se encuentran dispersos por todo el citoplasma en las células sin infectar, son reclutados al lugar de ensamblaje viral en las células infectadas (**Fig. 7-8**). Por el contrario, encontramos que los marcadores de lisosomas Lamp1 y Lamp2 se encontraban en su mayoría excluidos del lugar de ensamblaje y solamente en la periferia del mismo podía apreciarse una co-localización parcial con las glicoproteínas virales (**Fig. 8**). Nos llamó la atención que al cuantificar el grado de co-localización de los componentes celulares reclutados al lugar de ensamblaje con las proteínas virales, éste siempre era bajo exceptuando el del TfR (**Fig. 6-9**).

Este resultado era llamativo ya que esperábamos observar en los estudios de IF que al menos los marcadores que se encuentran incorporados en la envoltura viral, como son el TGN46, el EEA1, la anexina I, el CD63 y el CI-M6PR (**Fig. 10, Fig. 12, Fig. 13**) mostrasen una mayor co-localización con las proteínas virales. Este bajo nivel de co-localización observado en los análisis de IF puede tener varias explicaciones. Primero, la mayor parte del total de las proteínas celulares y virales puede encontrarse en diferentes dominios o sub-regiones del lugar de ensamblaje, y segundo, la accesibilidad de los anticuerpos a sus antígenos puede ser diferente si estos se encuentran localizados en las membranas celulares que si se encuentran en la membrana viral. Debido a la asociación compacta de las proteínas del tegumento con la cara interna de la envoltura viral o a la alta curvatura de la membrana de la envoltura, el acceso de los anticuerpos a los antígenos puede verse dificultado, resultando en una baja co-localización.

A continuación, analizamos la expresión de estos marcadores celulares en las células infectadas por el CMVH mediante qRT-PCR y WB y encontramos que el virus regula tanto los niveles de transcritos como los de proteína. La transcripción del TGN46, HRS, anexina I y CD63 se redujo durante la infección. La transcripción del EEA1 y CI-M6PR apenas varió mientras que la del TfR y CD-M6PR se indujo transitoriamente a día 1 y después bajó. Los niveles de proteína disminuyeron para el TGN46, el CD63 y el CD-M6PR, lo que es consistente con los resultados que obtenemos mediante IF donde detectamos una reducción en la tinción con estos marcadores en algunas células; la expresión de la proteína se mantuvo estable para el EEA1, HRS, anexina I y CI-M6PR, y aumentó para el TfR.

Las técnicas de inmuno-localización mediante IF y análisis por microscopía confocal nos permitieron detectar alteraciones en la distribución de muchos de los marcadores analizados en las células infectadas por el CMVH; sin embargo, si queremos estudiar la localización exacta en el entorno celular de un componente viral o celular, necesitamos aplicar técnicas que permitan una mayor resolución como es la microscopía electrónica (ME). En este sentido, la técnica de inmuno-marcaje con oro en crio-secciones conocida como Tokuyasu (Tokuyasu, 1973) es la más recomendable, si bien solo permite la detección de los antígenos expuestos en la superficie de una sección ultrafina. Esto supondría una gran dificultad para aquellos marcadores celulares que se localizan en un área concreta de la célula y cuya expresión está disminuida en las células infectadas. Así que decidimos investigar su posible presencia en la envoltura virales mediante inmuno-marcajes con oro y ME de las partículas virales aisladas. La cuantificación de estos inmuno-marcajes mostró que los marcadores TGN46 y CD63 estaban asociados con las envolturas virales y, lo que es más importante, la tinción doble con estos dos marcadores reveló que ambas proteínas se localizaban en la misma envoltura viral (**Fig. 13**). También encontramos que el EEA1 se asociaba en algunas



partículas virales; un resultado consistente con datos previos que localizaban al marcador EEA1 a la zona de ensamblaje viral (Das *et al.*, 2007). El marcador de endosomas de reciclaje TfR también se encontró incorporado en las envolturas virales; en los ensayos de IF este marcador mostró la co-localización más alta con la proteína de la envoltura viral UL33 en la zona de ensamblaje, lo que sugiere la posible participación de las membranas de los endosomas de reciclaje en el envolvimiento del CMVH, de acuerdo con los datos del grupo de William Britt (Krzyzaniak *et al.*, 2009). Por el contrario, el marcador HRS, que se une al fosfatidil-inositol-3-fosfato y a receptores ubiquitinados en la ruta degradativa que lleva hasta los MVBs (Raiborg *et al.*, 2002), apareció tiñendo muy pocas partículas virales; sin embargo, la anexina I, una proteína regulada por calcio que se asocia a membranas y está implicada en el transporte del receptor de crecimiento epidérmico (Futter *et al.*, 1993), se encontró en algunos viriones, lo que está en consonancia con la identificación de esta proteína en las partículas virales mediante análisis de espectrometría de masas (Varnum *et al.*, 2004). Cuando analizamos la presencia de los receptores de la manosa-6-fosfato, que viajan entre el TGN los endosomas (Klumperman *et al.*, 1993), en las partículas virales, encontramos que el CI-M6PR se incorporaba en las envolturas de algunas partículas mientras que el CD-M6PR marcaba muy pocos viriones (**Fig. 13 y Tabla I**).

Estos resultados fueron confirmados mediante el análisis de WB de los sobrenadantes de las células infectadas y de viriones altamente purificados. Estos análisis mostraron la presencia de los marcadores TfR, CI-M6PR, TGN y CD63 en virus secretados a los sobrenadantes por las células infectadas como en los viriones purificados. Sin embargo, no conseguimos detectar mediante WB la anexina I en los sobrenadantes de las células infectadas ni en los viriones purificados, ni el EEA1 en los viriones purificados, quizás debido a que los niveles de estas proteínas asociadas a los viriones pudieran estar por debajo de los límites de detección de esta técnica.

A continuación, nos preguntamos si las partículas virales que contenían estos marcadores eran infectivas. Para contestar a esta pregunta, llevamos a cabo ensayos de inmuno-precipitación de viriones y éstos demostraron que las partículas virales que incorporan en la envoltura los marcadores TGN46 y CD63 resultan infecciosas.

Tanto nuestras inmuno-localizaciones como nuestros análisis por WB han revelado que casi todos los marcadores celulares analizados se incorporan en los viriones del CMVH. Este dato plantea la cuestión de la especificidad que tiene el virus por las membranas en que se envuelve. Según nuestros resultados, es probable que las núcleo-cápsidas del CMVH sean capaces de envolverse con casi cualquier membrana que contenga glicoproteínas virales y proteínas del tegumento que dirijan este proceso. El inmuno-marcaje con oro en partículas aisladas reveló que no todas ellas están marcadas para la glicoproteína viral gH. Esto puede deberse al límite de sensibilidad que tiene la técnica y a que la accesibilidad del anticuerpo o de la PAG al epítipo no es total, o bien a que algunas partículas virales no incorporan la glicoproteína gH u otras glicoproteínas virales en su envoltura lo que daría lugar a partículas no infecciosas. En este sentido, y en concordancia con esta última posibilidad, se ha demostrado que para el CMVH el ratio del número de partículas virales totales frente al número de viriones infecciosos es inusualmente alta, para la cepa AD169, por ejemplo, se encontraron de 160 a 490 partículas no infectivas por cada partícula infectiva (Benyesh-Melnick *et al.*, 1966).



Cómo se transportan las proteínas virales hasta el área de ensamblaje y cómo se incorporan a las membranas donde el CMVH adquiere la envoltura, son procesos aún desconocidos. Recientemente, se han identificado diversas señales de destino en algunas proteínas virales tales como un cluster ácido presente en las colas citoplásmicas de las glicoproteínas gB y gM, y en la proteína del tegumento viral pp28 (Crump *et al.*, 2003, Seo *et al.*, 2006). Estas señales son reconocidas por proteínas implicadas en el transporte de proteínas celulares, como la proteína PACS-1, que participa en el transporte retrógrado de los M6PRs desde los endosomas hasta el TGN. PACS-1 no sólo es capaz de reconocer y de interactuar con el cluster ácido de la cola citoplásmica de la gB (Wan *et al.*, 1998), sino que se ha demostrado que el silenciamiento de PACS-1 reduce la producción viral del CMVH (Crump *et al.*, 2003). Estos hallazgos apuntan hacia la interesante posibilidad de que la proteína viral gB y el CI-M6PR celular utilizaran la misma ruta de transporte celular para trasladarse hasta el área de ensamblaje, la ruta entre los endosomas y el TGN, con lo que ambas se encontrarían incorporadas en el mismo tipo de membranas que podrían ser las que usa el CMVH para envolverse. También sería posible que, como ocurre para los α -herpesvirus VHS-1 y varicela zóster (Brunetti *et al.*, 1998), el CMVH contuviese glicoproteínas modificadas por la manosa-6-fosfato (M6P) y en consecuencia, fuesen ligandos para los M6PRs. En conjunto, estos resultados respaldan la participación de las vesículas de transporte anterógrado o retrógrado entre el TGN y los endosomas en el envolvimiento del CMVH.

Teniendo en cuenta todos nuestros resultados, proponemos un modelo para las etapas finales de la morfogénesis viral (**Fig. 24**) en el que las núcleo-cápsidas rodeadas del tegumento presentes en el lugar de ensamblaje se envuelven en cisternas membranosas que tienen características tanto del TGN como de los endosomas. Para conseguir esto, es posible que el virus sea capaz de expandir la ruta de vesículas de tránsito entre el TGN y los endosomas, o bien de inducir la formación de un nuevo compartimento híbrido entre el TGN y los endosomas. En las células sin infectar, las rutas de transporte celulares están bien definidas y separadas. Sin embargo, en esta investigación hemos comprobado que cuando el virus infecta una célula induce cambios profundos en las rutas de transporte celulares, manipulándolas y expandiéndolas y/o fundiéndolas en su beneficio, de manera que ya no es posible hablar con propiedad de marcadores correspondientes a una u otra ruta. En este nuevo modelo de morfogénesis reconciliamos la aparente controversia que existía en el campo respecto al lugar de ensamblaje del CMVH (Cepeda *et al.*, 2010).

¿Este tipo de membranas son utilizadas solo por el CMVH o por otros herpes-virus? Recientemente se ha descrito que el β -herpes-virus, herpes-virus humano 6 (HVH-6), también se envuelve en membranas derivadas del TGN y los MVBs, y que los marcadores TGN46 y CD63 se encuentran en los viriones del HVH-6 (Mori *et al.*, 2008); además, los autores proponen que el virus explota la ruta de secreción de exosomas para liberarse. Estos datos indican que tanto el CMVH como el HVH-6 se envuelven en membranas que tienen características híbridas entre el TGN y los endosomas, sugiriendo que ambos pueden tener mecanismos de morfogénesis similares.

El siguiente objetivo que nos propusimos consistía en identificar algunas de las proteínas celulares que participan en este proceso. Para ello, exploramos la posible relación entre el CMVH y componentes del transporte mediado por vesículas. Teniendo en cuenta los datos de análisis de expresión de proteínas revelados por los estudios de microarrays en las células infectadas por el CMVH, analizamos el papel de la proteína SNARE sintaxina 3 (STX3), cuya expresión aparece inducida en los microarrays (Paul Kellam y Vincent Emery comunicación personal, Hertel *et al.*, 2004), en la morfogénesis del CMVH.



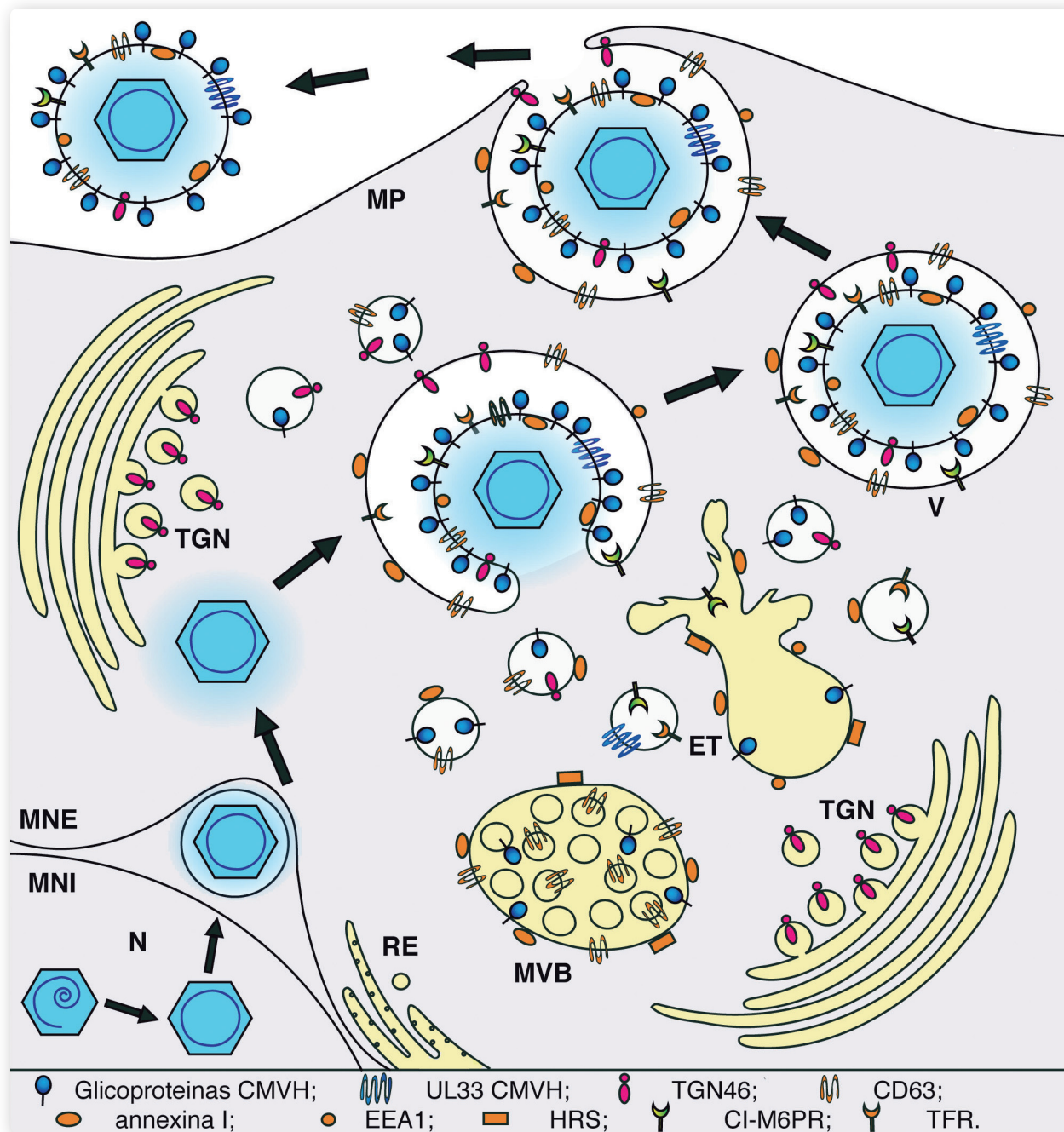


Figura 24

Modelo de la morfogénesis del CMVH. Las núcleo-cápsidas se ensamblan en el núcleo, viajan a través de las membranas nucleares/RE al citoplasma donde adquieren su envoltura en membranas de naturaleza híbrida entre el TGN y los endosomas, o bien en membranas procedentes de vesículas de transporte entre el TGN y los endosomas. Durante el proceso de envolvimiento, glicoproteínas virales y las proteínas celulares TGN46, CD63, anexina I, EEA1, TFR y CI-M6PR se incorporan en las envolturas virales. Los viriones maduros se trasladan hasta la membrana plasmática en una vacuola y allí se liberan al espacio extracelular. MNI: membrana nuclear interna, MNE: membrana nuclear externa, RE: retículo endoplásmico, TGN: red del trans-Golgi “trans-Golgi network”, MVB: cuerpo multivesicular, ET: endosoma temprano, MP: membrana plasmática.



Se ha descrito que la STX3 participa en el transporte de vesículas exocíticas hasta la membrana plasmática (Low *et al.*, 1996), en los eventos de expansión de membranas celulares (Darios *et al.*, 2006, Ammar *et al.*, 2002, Kwok *et al.*, 2008) y en procesos de fusión homotípica de membranas (Hansen *et al.*, 1999), lo que la convierte en un candidato muy interesante en la interacción del CMVH con las membranas celulares.

Comenzamos este estudio analizando la expresión de la STX3 en fibroblastos humanos infectados por el CMVH mediante qRT-PCR y WB. Este tipo no expresa la STX3; sin embargo, en las células infectadas por el CMVH, tanto la transcripción como la expresión de la STX3 se detectan desde tiempos tempranos tras la infección y se mantienen durante la infección. Este dato podría sugerir la participación de la STX3 en alguna de las etapas iniciales del ciclo de vida del CMVH, como podría ser el establecimiento de la zona de ensamblaje viral. Sin embargo, nuestro objetivo era desentrañar las interacciones del virus con las membranas celulares en las últimas etapas del ensamblaje y secreción viral, por lo que centramos nuestro trabajo en la fase citoplásmica de la morfogénesis viral.

Continuamos nuestro análisis estudiando la distribución subcelular de la STX3 en las células infectadas por el CMVH mediante IF y detectamos que la proteína se encuentra localizada en la membrana plasmática e intracelularmente, en el área de ensamblaje viral (**Fig. 15**). Esta distribución es consistente con datos previos en la literatura que describían que la STX3 se encuentra distribuida en la membrana plasmática en las células epiteliales polarizadas (Low *et al.*, 1996, Li *et al.*, 2002), así como intracelularmente en las células parietales gástricas, en los fibroblastos normales de riñón de rata, y en las células fotorreceptoras de la retina (Peng *et al.*, 1997, Band *et al.*, 2005, Kwok *et al.*, 2008).

Para estudiar en mayor detalle la localización exacta en el entorno celular de la STX3, llevamos a cabo estudios de inmuno-marcaje con oro en crio-secciones de células infectadas por el CMVH mediante la técnica de Tokuyasu, seguida de análisis de las secciones mediante microscopía electrónica (ME). Estos estudios mostraron que la STX3 estaba presente en la membrana plasmática, en cisternas del aparato de Golgi y en pequeñas vesículas (**Fig. 17**), lo que sugiere que esta proteína podría viajar entre estos compartimentos o que podría operar en múltiples eventos de fusión en la célula. El dato clave que obtenemos de estos análisis morfológicos es que la STX3 se encuentra asociada a las membranas en que se están envolviendo los virus y en la envoltura viral (**Fig. 17**). Confirmamos que la STX3 se encuentra incorporada en las envolturas virales llevando a cabo un inmuno-marcaje con oro en viriones aislados con un anticuerpo anti-STX3 cuando éstos procedían de células infectadas parentales, o con un anti-myc cuando los viriones provenían de la línea celular que expresa la construcción STX3-c-myc. En ambos casos detectamos la STX3 en las envolturas virales (**Fig. 18**). La asociación física de la STX3 con los viriones del CMVH podría reflejar la posible participación de esta proteína SNARE en el transporte de componentes virales y celulares a la zona de ensamblaje y/o en la fusión de las vesículas que finalmente generarán las cisternas donde se envuelven las núcleo-cápsidas virales, procesos que deben estar relacionados. Respaldando esta última propuesta, se ha demostrado que la STX3 participa en procesos intracelulares de fusión homotípica (fusión entre elementos de la misma naturaleza) como la fusión entre los gránulos secretores de las células zimogénicas del páncreas (Hansen *et al.*, 1999), lo que sugiere que la STX3 podría participar en la formación de las cisternas membranosas donde se envuelven los virus.

A la vista de estos datos, decidimos investigar la implicación funcional de la STX3 en la morfogénesis del CMVH mediante el análisis del impacto de su silenciamiento y del posterior rescate de su expresión, sobre la producción viral. El silenciamiento de la STX3 redujo el número de viriones infectivos, tanto intracelulares





Discusión

como secretados al medio extracelular, ~4 veces (**Fig. 20**). Este efecto parcial y reproducible se puede explicar debido a la presencia de cantidades residuales de la STX3 aún presentes tras el silenciamiento mediante los ARN interferentes, debido a que otras proteínas SNAREs podrían reemplazar a la STX3 en su función cuando ésta falta, como se ha descrito para las SNAREs SNAP25 y SNAP23 durante la exocitosis regulada en las células cromafínicas (Sorensen *et al.*, 2003), o bien debido a la existencia de cierta redundancia en las rutas de transporte de las proteínas virales al lugar de ensamblaje, como se ha sugerido para el receptor de quimioquinas viral US28 y la proteína de la envoltura viral gB, las cuales pueden viajar hasta la zona de ensamblaje vía la membrana plasmática o mediante una ruta directa desde el TGN (Fraile-Ramos *et al.*, 2003, Crump *et al.*, 2003).

A continuación nos preguntamos si el efecto que detectamos en términos de la producción viral cuando silenciamos la STX3 era específico para el CMVH o si la STX3 participaba en la producción de otros herpes-virus. Para contestar esta pregunta, repetimos los ensayos funcionales, pero esta vez para un α -herpesvirus como es el virus herpes simplex tipo I (VHS-I). Sin embargo, esta vez no detectamos cambios en la producción viral cuando silenciamos la STX3 (**Fig. 21**). Este interesante resultado indica que el efecto que vemos en la producción viral para el CMVH es específico, y refleja las diferencias existentes entre la morfogénesis de ambos virus.

Una vez que detectamos a la STX3 asociada físicamente a las envolturas virales y que comprobamos que juega un papel en la producción viral, decidimos aplicar una aproximación morfológica a nivel ultra-estructural para estudiar el efecto del silenciamiento de esta proteína en la morfogénesis de las partículas del CMVH. Para ello, reconstruimos el área de ensamblaje viral mediante la obtención de cortes seriados de monocapas de células infectadas embebidas “*in situ*” y cuantificamos las partículas virales en al menos 5 células parentales o silenciadas para la STX3. La cuantificación reveló un incremento en el número de DBs en las células silenciadas (**Fig. 22 y Tabla 2**). Este dato indica que podrían existir diferencias entre la morfogénesis de los viriones y la de los DBs, y que la morfogénesis de estos últimos estaría estimulada en las células silenciadas. De hecho, los análisis proteómicos han mostrado que algunas proteínas virales se incorporan con mayor preferencia en los viriones que en los DBs (Varnum *et al.*, 2004), como la fosfoproteína del tegumento pp150, que es esencial para la maduración y la secreción de los viriones pero que resulta dispensable para la secreción de los DBs (AuCoin *et al.*, 2006). Nuestra cuantificación muestra además en las células silenciadas un incremento en el número de partículas virales, tanto viriones como DBs, que se encuentran adquiriendo la envoltura. Este resultado sugiere que el proceso de envolvimiento final podría estar retardado en estas células, lo que llevaría a la reducción en la producción del número de virus infectivos que detectamos en los experimentos funcionales. La razón de este retraso podría ser un defecto en el transporte de las proteínas virales y/o componentes celulares necesarios para el proceso de envolvimiento mediado por la STX3, hasta el lugar de ensamblaje. También podría ser posible que en las células silenciadas, la cantidad disponible de pequeñas cisternas donde se envuelven los virus estuviese disminuida, lo que deceleraría el proceso de envolvimiento. Al mismo tiempo, encontramos que la producción viral estaba aumentada en las células que expresan la construcción STX3-c-myc (**Fig. 20**). En este caso, las cisternas disponibles para el proceso de envolvimiento podrían estar aumentadas, permitiendo que un mayor número de núcleo-cápsidas pudieran envolverse en estas membranas. A este respecto, resulta interesante destacar que la STX3 se ha relacionado con procesos celulares que requieren una alta demanda de membranas como ocurre en los procesos de crecimiento de las neuritas (Darios *et al.*, 2006), o la continua renovación de las membranas del disco del segmento exterior de los bastones de





las células fotorreceptoras (Chuang *et al.*, 2007). También es posible que la STX3 participe directamente en el último paso de sellado/fusión de las membranas que envuelven a los viriones y que da lugar al virión maduro dentro de la vacuola en la que se transporta .

Tras demostrar que la STX3 participa en la morfogénesis viral, tratamos de desentrañar los mecanismos que subyacen a este proceso. Para ello, llevamos a cabo un análisis de la expresión y la distribución de varios marcadores celulares en células MeWo, que expresan de manera endógena la STX3. Nuestros estudios de IF, mostraron que en las células MeWo silenciadas para la STX3, la expresión de las glicoproteínas de la membrana lisosomal CD63, Lamp1 y Lamp2 estaba reducida (**Fig. 23**), probablemente debido a que la tasa de degradación de estos marcadores está aumentada en las células silenciadas, (**Fig. 23D**) como indica la menor vida media de CD63 en estas células. Estos datos indican la participación de esta proteína SNARE en las rutas de tráfico y/o en la biogénesis de los MVBs/lisosomas. Desentrañar el mecanismo mediante el cual la STX3 influye sobre el tráfico y la degradación de las glicoproteínas de la membrana lisosomal y/o en la biogénesis de los lisosomas requerirá futuros estudios. En lo que respecta al CMVH, aunque la STX3 influye en la expresión de los Lamp1 y Lamp2, pensamos que los lisosomas no desempeñan un papel fundamental en la morfogénesis del virus ya que en este trabajo de tesis, y también otros autores, se ha encontrado que las proteínas lisosomales Lamp1 y Lamp2, y la enzima lisosomal cathepsina D están excluidas de la zona de ensamblaje viral (Cepeda *et al.*, 2010, Homman-Loudiyi *et al.*, 2003, Krzyzaniak *et al.*, 2009). Sin embargo, el silenciamiento y el posterior rescate de la expresión de la STX3 afecta a los niveles de CD63 en las células infectadas por el CMVH, siendo CD63 uno de los componentes celulares reclutados al área de ensamblaje e incorporado en la envoltura viral (Cepeda *et al.*, 2010). En conjunto, estos datos sugieren la participación de la STX3 y de las membranas de los MVBs/lisosomas en la morfogénesis del CMVH.

Respecto a este segundo objetivo, el trabajo futuro incluye la identificación del cargo transportado en las vesículas que contienen la STX3, las proteínas SNARE que forman el complejo de fusión junto con la STX3 en las células infectadas por el CMVH y las pequeñas GTPasas Rab y las proteínas accesorias que regulan los procesos de fusión donde participa la STX3. También será interesante investigar si las proteínas Rab necesarias para la morfogénesis del CMVH, Rab27a (Fraile-Ramos *et al.*, 2010) o Rab11 (Krzyzaniak *et al.*, 2009) interaccionan con la STX3. De manera interesante, se ha descrito que estas dos pequeñas GTPasas participan en la maduración/secreción de MVBs en linfocitos T citotóxicos (Ostrowski *et al.*, 2010).







conclusiones







Conclusiones

- 1 El citomegalovirus humano induce profundos cambios en los sistemas de membranas celulares reclutando membranas de la red del trans-Golgi y de los endosomas al lugar de ensamblaje.
- 2 El citomegalovirus humano adquiere su envoltura final de membranas que contienen marcadores del TGN y de los endosomas mediante la expansión de vesículas de la ruta de transporte entre los endosomas y el TGN o mediante la generación de un compartimento híbrido que contiene marcadores del TGN y de los endosomas
- 3 La proteína SNARE syntaxina 3, que lleva a cabo eventos de fusión de membranas celulares, participa en la morfogénesis del citomegalovirus humano a través de un mecanismo que probablemente involucra membranas provenientes de los MVBs/lisosomas.
- 4 La syntaxina 3 participa en el transporte de las glicoproteínas de las membranas lisosomales y/o en la biogénesis de los lisosomas.





bibliografía







- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2008) Vesicular Traffic in the Secretory and Endocytic Pathways. In *Molecular Biology of the Cell*, T.F. Group. (ed.). Oxon, Garland Science Publishing, pp. 599-652.
- Alford, C.A., Stagno, S., Pass, R.F. and Britt, W.J. (1990). Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Rev Infect Dis* 12 Suppl 7, S745-753.
- Ammar, D.A., Zhou, R., Forte, J.G. and Yao, X. (2002). Syntaxin 3 is required for cAMP-induced acid secretion: streptolysin O-permeabilized gastric gland model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282, 23-33.
- Atalay, R., Zimmermann, A., Wagner, M., Borst, E., Benz, C., Messerle, M. and Hengel, H. (2002). Identification and expression of human cytomegalovirus transcription units coding for two distinct Fcγ receptor homologs. *J Virol* 76, 8596-8608.
- AuCoin, D.P., Smith, G.B., Meiering, C.D. and Mocarski, E.S. (2006). Betaherpesvirus-conserved cytomegalovirus tegument protein ppUL32 (pp150) controls cytoplasmic events during virion maturation. *J Virol* 80, 8199-8210.
- Baldanti, F., Lurain, N. and Gerna, G. (2004). Clinical and biologic aspects of human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. *Hum Immunol* 65, 403-409.
- Band, A.M. and Kuismanen, E. (2005). Localization of plasma membrane t-SNAREs syntaxin 2 and 3 in intracellular compartments. *BMC Cell Biol* 6, 26.
- Bennett, M.K., Calakos, N. and Scheller, R.H. (1992). Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* 257, 255-259.
- Bennett, M.K., Garcia-Arreola, J.E., Elferink, L.A., Peterson, K., Fleming, A.M., Hazuka, C.D. and Scheller, R.H. (1993). The syntaxin family of vesicular transport receptors. *Cell* 74, 863-873.
- Benyesh-Melnick, M., Probstmeyer, F., McCombs, R., Brunschwig, J.P. and Vonka, V. (1966). Correlation between infectivity and physical virus particles in human cytomegalovirus. *J Bacteriol* 92, 1555-1561.
- Blankenship, C. A., Shenk, T. (2002). Mutant human cytomegalovirus lacking the immediate-early TRS1 coding region exhibits a late defect. *J Virol* 76, 12290-12299.
- Blott, E.J. and Griffiths, G.M. (2002). Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 122-131.
- Bodaghi, B., Slobbe-van Drunen, M.E., Topilko, A., Perret, E., Vossen, R.C., van Dam-Mieras, M.C., et al. (1999). Entry of human cytomegalovirus into retinal pigment epithelial and endothelial cells by endocytosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 2598-2607.
- Boulaflos, A., Faso, C. and Brandizzi, F. (2008). Deciphering the Golgi apparatus: from imaging to genes. *Traffic* 9, 1613-1617.
- Bresnahan, W.A. and Shenk, T.E. (2000). UL82 virion protein activates expression of immediate early viral genes in human cytomegalovirus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14506-14511.
- Breuza, L., Fransen, J. and Le Bivic, A. (2000). Transport and function of syntaxin 3 in human epithelial intestinal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C1239-1248.



- Britt, W.J., Jarvis, M., Seo, J.Y., Drummond, D. and Nelson, J. (2004). Rapid genetic engineering of human cytomegalovirus by using a lambda phage linear recombination system: demonstration that pp28 (UL99) is essential for production of infectious virus. *J Virol* 78, 539-543.
- Browne, E.P., Wing, B., Coleman, D. and Shenk, T. (2001). Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus-infected fibroblasts: viral block to the accumulation of antiviral mRNAs. *J Virol* 75, 12319-12330.
- Brunetti, C.R., Dingwell, K.S., Wale, C., Graham, F.L. and Johnson, D.C. (1998). Herpes simplex virus gD and virions accumulate in endosomes by mannose 6-phosphate-dependent and -independent mechanisms. *J Virol* 72, 3330-3339.
- Buchkovich, N.J., Maguire, T.G., Paton, A.W., Paton, J.C. and Alwine, J.C. (2009). The endoplasmic reticulum chaperone BiP/GRP78 is important in the structure and function of the human cytomegalovirus assembly compartment. *J Virol* 83, 11421-11428.
- Cantin, R., Methot, S. and Tremblay, M.J. (2005). Plunder and stowaways: incorporation of cellular proteins by enveloped viruses. *J Virol* 79, 6577-6587.
- Castle, A.M., Huang, A.Y. and Castle, J.D. (2002). The minor regulated pathway, a rapid component of salivary secretion, may provide docking/fusion sites for granule exocytosis at the apical surface of acinar cells. *J Cell Sci* 115, 2963-2973.
- Cepeda, V., Esteban, M. and Fraile-Ramos, A. (2010). Human cytomegalovirus final envelopment on membranes containing both trans-Golgi network and endosomal markers. *Cell Microbiol* 12, 386-404.
- Chen, J.W., Murphy, T. L., Willingham, M. C., Pastan, I., August, J.T. (1985). Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. *J Cell Biol* 101, 85-95.
- Chuang, J.Z., Zhao, Y. and Sung, C.H. (2007). SARA-regulated vesicular targeting underlies formation of the light-sensing organelle in mammalian rods. *Cell* 130, 535-547.
- Compton, T., Nepomuceno, R.R. and Nowlin, D.M. (1992). Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology* 191, 387-395.
- Cranage, M. P., Kouzarides, T., Bankier, A. T., Satchwell, S., Weston, K., Tomlinson, P., Barrell, B., Hart, H., Bell, S. E., Minson, A. C. et al. (1986). Identification of the human cytomegalovirus glycoprotein B gene and induction of neutralizing antibodies via its expression in recombinant vaccinia virus. *EMBO J* 5, 3057-3063.
- Cranage, M. P., Smith, G. L., Bell, S. E., Hart, H., Brown, C., Bankier, A. T., Tomlinson, P., Barrell, B. G., Minson, T. C. (1988). Identification and expression of a human cytomegalovirus glycoprotein with homology to the Epstein-Barr virus BXLF2 product, varicella-zoster virus gpIII, and herpes simplex virus type 1 glycoprotein H. *J Virol* 62, 1416-1422.
- Crump, C.M., Hung, C.H., Thomas, L., Wan, L. and Thomas, G. (2003). Role of PACS-1 in trafficking of human cytomegalovirus glycoprotein B and virus production. *J Virol* 77, 11105-11113.
- Dahlgren, C., Carlsson, S. R., Karlsson, A., Lundqvist, H., Sjolin, C. (1995). The lysosomal membrane glycoproteins Lamp-1 and Lamp-2 are present in mobilizable organelles, but are absent from the azurophilic granules of human neutrophils. *Biochem J* 311 (Pt 2), 667-674.



- Darios, F. and Davletov, B. (2006). Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3. *Nature* 440, 813-817.
- Das, S., Vasanji, A. and Pellett, P.E. (2007). Three-dimensional structure of the human cytomegalovirus cytoplasmic virion assembly complex includes a reoriented secretory apparatus. *J Virol* 81, 11861-11869.
- De Matteis, M.A. and Luini, A. (2008). Exiting the Golgi complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 273-284.
- Domingo, C., Gadea, I., Pardeiro, M., Castilla, C., Fernandez, S., Fernandez-Clua, M.A., et al. (2003). Immunological properties of a DNA plasmid encoding a chimeric protein of herpes simplex virus type 2 glycoprotein B and glycoprotein D. *Vaccine* 21, 3565-3574.
- Esser, M.T., Graham, D.R., Coren, L.V., Trubey, C.M., Bess, J.W., Jr., Arthur, L.O., et al. (2001). Differential incorporation of CD45, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), and major histocompatibility complex class I and II molecules into human immunodeficiency virus type I virions and microvesicles: implications for viral pathogenesis and immune regulation. *J Virol* 75, 6173-6182.
- Fasshauer, D., Sutton, R.B., Brunger, A.T. and Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15781-15786.
- Feire, A.L., Koss, H. and Compton, T. (2004). Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15470-15475.
- Fernandez, I., Ubach, J., Dulubova, I., Zhang, X., Sudhof, T.C. and Rizo, J. (1998). Three-dimensional structure of an evolutionarily conserved N-terminal domain of syntaxin 1A. *Cell* 94, 841-849.
- Foletti, D.L., Lin, R., Finley, M.A. and Scheller, R.H. (2000). Phosphorylated syntaxin 1 is localized to discrete domains along a subset of axons. *J Neurosci* 20, 4535-4544.
- Fontana, J., Lopez-Montero, N., Elliott, R.M., Fernandez, J.J. and Risco, C. (2008). The unique architecture of Bunyamwera virus factories around the Golgi complex. *Cell Microbiol* 10, 2012-2028.
- Fox, J.C., Griffiths, P.D. and Emery, V.C. (1992). Quantification of human cytomegalovirus DNA using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 73 (Pt 9), 2405-2408.
- Fraile-Ramos, A., Cepeda, V., Elstak, E. and van der Sluijs, P. (2010). Rab27a is required for human cytomegalovirus assembly. *PLoS One* 5, e15318.
- Fraile-Ramos, A., Kledal, T. N., Pelchen-Matthews, A., Bowers, K., Schwartz, T.W., Marsh, M. (2001). The human cytomegalovirus US28 protein is located in endocytic vesicles and undergoes constitutive endocytosis and recycling. *Mol Biol Cell* 12, 1737-1749.
- Fraile-Ramos, A., Kohout, T.A., Waldhoer, M. and Marsh, M. (2003). Endocytosis of the viral chemokine receptor US28 does not require beta-arrestins but is dependent on the clathrin-mediated pathway. *Traffic* 4, 243-253.
- Fraile-Ramos, A., Pelchen-Matthews, A., Kledal, T.N., Browne, H., Schwartz, T.W. and Marsh, M. (2002). Localization of HCMV UL33 and US27 in endocytic compartments and viral membranes. *Traffic* 3, 218-232.



- Fraile-Ramos, A., Pelchen-Matthews, A., Risco, C., Rejas, M.T., Emery, V.C., Hassan-Walker, A.F., et al. (2007). The ESCRT machinery is not required for human cytomegalovirus envelopment. *Cell Microbiol* 9, 2955-2967.
- Futter, C.E., Felder, S., Schlessinger, J., Ullrich, A. and Hopkins, C.R. (1993). Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* 120, 77-83.
- Gaisano, H.Y., Ghai, M., Malkus, P.N., Sheu, L., Bouquillon, A., Bennett, M.K. and Trimble, W.S. (1996). Distinct cellular locations of the syntaxin family of proteins in rat pancreatic acinar cells. *Mol Biol Cell* 7, 2019-2027.
- Gerna, G., Baldanti, F. and Revello, M.G. (2004). Pathogenesis of human cytomegalovirus infection and cellular targets. *Hum Immunol* 65, 381-386.
- Gibson, W. (1996). Structure and assembly of the virion. *Intervirology* 39, 389-400.
- Hansen, N.J., Antonin, W. and Edwardson, J.M. (1999). Identification of SNAREs involved in regulated exocytosis in the pancreatic acinar cell. *J Biol Chem* 274, 22871-22876.
- Hertel, L. and Mocarski, E.S. (2004). Global analysis of host cell gene expression late during cytomegalovirus infection reveals extensive dysregulation of cell cycle gene expression and induction of Pseudomitosis independent of US28 function. *J Virol* 78, 11988-12011.
- Hibi, T., Hirashima, N. and Nakanishi, M. (2000). Rat basophilic leukemia cells express syntaxin-3 and VAMP-7 in granule membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 271, 36-41.
- Homman-Loudiyi, M., Hultenby, K., Britt, W. and Soderberg-Naucler, C. (2003). Envelopment of human cytomegalovirus occurs by budding into Golgi-derived vacuole compartments positive for gB, Rab 3, trans-golgi network 46, and mannosidase II. *J Virol* 77, 3191-3203.
- Ibaraki, K., Horikawa, H.P., Morita, T., Mori, H., Sakimura, K., Mishina, M., et al. (1995). Identification of four different forms of syntaxin 3. *Biochem Biophys Res Commun* 211, 997-1005.
- Indran, S.V., Ballestas, M.E. and Britt, W.J. (2010). Bicaudal D1-dependent trafficking of human cytomegalovirus tegument protein pp150 in virus-infected cells. *J Virol* 84, 3162-3177.
- Irmieri, A., Gibson, W. (1983). Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* 130, 118-133.
- Isaacson, M.K., Juckem, L.K. and Compton, T. (2008). Virus entry and innate immune activation. *Curr Top Microbiol Immunol* 325, 85-100.
- Isacke, C.M., Lindberg, R.A. and Hunter, T. (1989). Synthesis of p36 and p35 is increased when U-937 cells differentiate in culture but expression is not inducible by glucocorticoids. *Mol Cell Biol* 9, 232-240.
- Jahn, R., Lang, T. and Sudhof, T.C. (2003). Membrane fusion. *Cell* 112, 519-533.
- Jahn, R. and Scheller, R.H. (2006). SNAREs-engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 631-643.
- Jordens, I., Marsman, M., Kuijl, C. and Neefjes, J. (2005). Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic* 6, 1070-1077.



- Klumperman, J., Hille, A., Veenendaal, T., Oorschot, V., Stoorvogel, W., von Figura, K. and Geuze, H.J. (1993). Differences in the endosomal distributions of the two mannose 6-phosphate receptors. *J Cell Biol* 121, 997-1010.
- Komada, M. and Kitamura, N. (1995). Growth factor-induced tyrosine phosphorylation of Hrs, a novel 115-kilodalton protein with a structurally conserved putative zinc finger domain. *Mol Cell Biol* 15, 6213-21.
- Kreitzer, G., Schmoranz, J., Low, S.H., Li, X., Gan, Y., Weimbs, T., et al. (2003). Three-dimensional analysis of post-Golgi carrier exocytosis in epithelial cells. *Nat Cell Biol* 5, 126-136.
- Krzyzaniak, M., Mach, M. and Britt, W.J. (2007). The cytoplasmic tail of glycoprotein M (gpUL100) expresses trafficking signals required for human cytomegalovirus assembly and replication. *J Virol* 81, 10316-10328.
- Krzyzaniak, M.A., Mach, M. and Britt, W.J. (2009). HCMV-encoded glycoprotein M (UL100) interacts with Rab11 effector protein FIP4. *Traffic* 10, 1439-1457.
- Kwok, M.C., Holopainen, J.M., Molday, L.L., Foster, L.J. and Molday, R.S. (2008). Proteomics of photoreceptor outer segments identifies a subset of SNARE and Rab proteins implicated in membrane vesicle trafficking and fusion. *Mol Cell Proteomics* 7, 1053-1066.
- Lang, T., Margittai, M., Holzler, H. and Jahn, R. (2002). SNAREs in native plasma membranes are active and readily form core complexes with endogenous and exogenous SNAREs. *J Cell Biol* 158, 751-760.
- Lapierre, L.A., Avant, K.M., Caldwell, C.M., Ham, A.J., Hill, S., Williams, J.A., et al. (2007). Characterization of immunisolated human gastric parietal cells tubulovesicles: identification of regulators of apical recycling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, 1249-1262.
- Lazzarotto, T., Gabrielli, L., Lanari, M., Guerra, B., Bellucci, T., Sassi, M. and Landini, M.P. (2004). Congenital cytomegalovirus infection: recent advances in the diagnosis of maternal infection. *Hum Immunol* 65, 410-415.
- Li, X., Low, S.H., Miura, M. and Weimbs, T. (2002). SNARE expression and localization in renal epithelial cells suggest mechanism for variability of trafficking phenotypes. *Am J Physiol Renal Physiol* 283, 1111-1122.
- Low, S.H., Chapin, S.J., Weimbs, T., Komuves, L.G., Bennett, M.K. and Mostov, K.E. (1996). Differential localization of syntaxin isoforms in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 7, 2007-2018.
- Luzio, J.P., Pryor, P.R. and Bright, N.A. (2007). Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 622-632.
- Manders, E.M.M., Verbeek, F.J. and Aten, J.A. (1993). Measurement of colocalization of objects in dual-color confocal images. *Journal of Microscopy-Oxford* 169, 375-382.
- Margulies, B.J., Browne, H. and Gibson, W. (1996). Identification of the human cytomegalovirus G protein-coupled receptor homologue encoded by UL33 in infected cells and enveloped virus particles. *Virology* 225, 111-125.
- Martens, S. and McMahon, H.T. (2008). Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 543-556.



- Martin-Martin, B., Nabokina, S.M., Lazo, P.A. and Mollinedo, F. (1999). Co-expression of several human syntaxin genes in neutrophils and differentiating HL-60 cells: variant isoforms and detection of syntaxin I. *J Leukoc Biol* 65, 397-406.
- McGeoch, D.J., Rixon, F.J. and Davison, A.J. (2006). Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res* 117, 90-104.
- McMahon, H.T. and Sudhof, T.C. (1995). Synaptic core complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP25 forms high affinity alpha-SNAP binding site. *J Biol Chem* 270, 2213-2217.
- McSharry, B.P., Jones, C.J., Skinner, J.W., Kipling, D. and Wilkinson, G.W. (2001). Human telomerase reverse transcriptase-immortalized MRC-5 and HCA2 human fibroblasts are fully permissive for human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 82, 855-863.
- Messner, D. J. (1993). The mannose receptor and the cation-dependent form of mannose 6-phosphate receptor have overlapping cellular and subcellular distributions in liver. *Arch Biochem Biophys* 306, 391-401.
- Mettenleiter, T.C., Klupp, B.G. and Granzow, H. (2009). Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res* 143, 222-234.
- Minson, A. C., Hodgman, T. C., Digard, P., Hancock, D. C., Bell, S. E., Buckmaster, E.A. (1986). An analysis of the biological properties of monoclonal antibodies against glycoprotein D of herpes simplex virus and identification of amino acid substitutions that confer resistance to neutralization. *J Gen Virol* 67 (Pt 6), 1001-1013.
- Misura, K.M., Scheller, R.H. and Weis, W.I. (2000). Three-dimensional structure of the neuronal-Sec I-syntaxin Ia complex. *Nature* 404, 355-362.
- Mocarski, E.S., Shenk, T. and Pass, R.F. (2007) Cytomegaloviruses. In *Fields virology*, 5th ed., D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, S.E. Strauss (eds.). Philadelphia, Pa., Lippincott-Raven Publishers, pp. 2701-2772.
- Moffat, J., Grueneberg, D.A., Yang, X., Kim, S.Y., Kloepper, A.M., Hinkle, G., et al. (2006). A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell* 124, 1283-1298.
- Moorman, N.J., Sharon-Friling, R., Shenk, T. and Cristea, I.M. (2010). A targeted spatial-temporal proteomics approach implicates multiple cellular trafficking pathways in human cytomegalovirus virion maturation. *Mol Cell Proteomics* 9, 851-860.
- Mori, Y., Koike, M., Moriishi, E., Kawabata, A., Tang, H., Oyaizu, H., et al. (2008). Human herpesvirus-6 induces MVB formation, and virus egress occurs by an exosomal release pathway. *Traffic* 9, 1728-1742.
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., et al. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267.
- Nowak, B., Sullivan, C., Sarnow, P., Thomas, R., Bricout, F., Nicolas, J.C., et al. (1984). Characterization of monoclonal antibodies and polyclonal immune sera directed against human cytomegalovirus virion proteins. *Virology* 132, 325-338.
- Nyholm, J.L., Schleiss, M.R. (2010). Prevention of maternal Cytomegalovirus infection: current status and future prospects. *Int J Womens Health*, 2, 23-35.



- Ogawa-Goto, K., Tanaka, K., Gibson, W., Moriishi, E., Miura, Y., Kurata, T., et al. (2003). Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J Virol* 77, 8541-8547.
- Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., et al. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* 12, 19-30; sup pp 11-13.
- Paumet, F., Le Mao, J., Martin, S., Galli, T., David, B., Blank, U. and Roa, M. (2000). Soluble NSF attachment protein receptors (SNAREs) in RBL-2H3 mast cells: functional role of syntaxin 4 in exocytosis and identification of a vesicle-associated membrane protein 8-containing secretory compartment. *J Immunol* 164, 5850-5857.
- Peng, X.R., Yao, X., Chow, D.C., Forte, J.G. and Bennett, M.K. (1997). Association of syntaxin 3 and vesicle-associated membrane protein (VAMP) with H⁺/K⁺-ATPase-containing tubulovesicles in gastric parietal cells. *Mol Biol Cell* 8, 399-407.
- Perlman, J.M. and Argyle, C. (1992). Lethal cytomegalovirus infection in preterm infants: clinical, radiological, and neuropathological findings. *Ann Neurol* 31, 64-68.
- Pizzorno, M.C., O'Hare, P., Sha, L., LaFemina, R.L. and Hayward, G.S. (1988). trans-activation and autoregulation of gene expression by the immediate-early region 2 gene products of human cytomegalovirus. *J Virol* 62, 1167-1179.
- Plachter, B., Sinzger, C. and Jahn, G. (1996). Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus. *Adv Virus Res* 46, 195-261.
- Prichard, M.N., Britt, W.J., Daily, S.L., Hartline, C.B. and Kern, E.R. (2005). Human cytomegalovirus UL97 Kinase is required for the normal intranuclear distribution of pp65 and virion morphogenesis. *J Virol* 79, 15494-15502.
- Radsak, K., Eickmann, M., Mockenhaupt, T., Bogner, E., Kern, H., Eis-Hubinger, A. and Reschke, M. (1996). Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. *Arch Virol* 141, 557-572.
- Raiborg, C. and Stenmark, H. (2002). Hrs and endocytic sorting of ubiquitinated membrane proteins. *Cell Struct Funct* 27, 403-408.
- Ravichandran, V., Chawla, A. and Roche, P.A. (1996). Identification of a novel syntaxin- and synaptobrevin/VAMP-binding protein, SNAP-23, expressed in non-neuronal tissues. *J Biol Chem* 271, 13300-13303.
- Razi, M. and Futter, C.E. (2006). Distinct roles for Tsg101 and Hrs in multivesicular body formation and inward vesiculation. *Mol Biol Cell* 17, 3469-3483.
- Richman, D.D., Buckmaster, A., Bell, S., Hodgman, C. and Minson, A.C. (1986). Identification of a new glycoprotein of herpes simplex virus type 1 and genetic mapping of the gene that codes for it. *J Virol* 57, 647-655.
- Rohn, W.M., Rouille, Y., Waguri, S. and Hoflack, B. (2000). Bi-directional trafficking between the trans-Golgi network and the endosomal/lysosomal system. *J Cell Sci* 113 (Pt 12), 2093-2101.
- Ryckman, B.J., Jarvis, M.A., Drummond, D.D., Nelson, J.A. and Johnson, D.C. (2006). Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes ULI28 to ULI50 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *J Virol* 80, 710-722.

- Sanchez, V., Greis, K.D., Sztul, E. and Britt, W.J. (2000a). Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. *J Virol* 74, 975-986.
- Sanchez, V., Sztul, E. and Britt, W.J. (2000b). Human cytomegalovirus pp28 (UL99) localizes to a cytoplasmic compartment which overlaps the endoplasmic reticulum-golgi-intermediate compartment. *J Virol* 74, 3842-3851.
- Savina, A., Fader, C.M., Damiani, M.T. and Colombo, M.I. (2005). Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic* 6, 131-143.
- Schierling, K., Stamminger, T., Mertens, T. and Winkler, M. (2004). Human cytomegalovirus tegument proteins ppUL82 (pp71) and ppUL35 interact and cooperatively activate the major immediate-early enhancer. *J Virol* 78, 9512-9523.
- Seo, J.Y. and Britt, W.J. (2006). Sequence requirements for localization of human cytomegalovirus tegument protein pp28 to the virus assembly compartment and for assembly of infectious virus. *J Virol* 80, 5611-5626.
- Severi, B., Landini, M.P. and Govoni, E. (1988). Human cytomegalovirus morphogenesis: an ultrastructural study of the late cytoplasmic phases. *Arch Virol* 98, 51-64.
- Sharma, N., Low, S.H., Misra, S., Pallavi, B. and Weimbs, T. (2006). Apical targeting of syntaxin 3 is essential for epithelial cell polarity. *J Cell Biol* 173, 937-948.
- Silva, M.C., Yu, Q.C., Enquist, L. and Shenk, T. (2003). Human cytomegalovirus UL99-encoded pp28 is required for the cytoplasmic envelopment of tegument-associated capsids. *J Virol* 77, 10594-10605.
- Sinzger, C., Schmidt, K., Knapp, J., Kahl, M., Beck, R., Waldman, J., et al. (1999). Modification of human cytomegalovirus tropism through propagation in vitro is associated with changes in the viral genome. *J Gen Virol* 80 (Pt 11), 2867-2877.
- Skepper, J.N., Whiteley, A., Browne, H. and Minson, A. (2001). Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway. *J Virol* 75, 5697-5702.
- Sorensen, J.B., Nagy, G., Varoqueaux, F., Nehring, R.B., Brose, N., Wilson, M.C. and Neher, E. (2003). Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23. *Cell* 114, 75-86.
- Soroceanu, L. and Cobbs, C.S. (2010). Is HCMV a tumor promoter? *Virus Res* Ahead of print.
- Spear, G.T., Lurain, N.S., Parker, C.J., Ghassemi, M., Payne, G.H. and Saifuddin, M. (1995). Host cell-derived complement control proteins CD55 and CD59 are incorporated into the virions of two unrelated enveloped viruses. Human T cell leukemia/lymphoma virus type I (HTLV-I) and human cytomegalovirus (HCMV). *J Immunol* 155, 4376-4381.
- Stackpole, C.W. (1969). Herpes-type virus of the frog renal adenocarcinoma. I. Virus development in tumor transplants maintained at low temperature. *J Virol* 4, 75-93.
- Stanton, R.J., McSharry, B.P., Rickards, C.R., Wang, E.C., Tomasec, P. and Wilkinson, G.W. (2007). Cytomegalovirus destruction of focal adhesions revealed in a high-throughput Western blot analysis of cellular protein expression. *J Virol* 81, 7860-7872.



- Steegmaier, M., Yang, B., Yoo, J.S., Huang, B., Shen, M., Yu, S., et al. (1998). Three novel proteins of the syntaxin/SNAP-25 family. *J Biol Chem* 273, 34171-34179.
- Stenberg, R.M., Fortney, J., Barlow, S.W., Magrane, B.P., Nelson, J.A. and Ghazal, P. (1990). Promoter-specific trans activation and repression by human cytomegalovirus immediate-early proteins involves common and unique protein domains. *J Virol* 64, 1556-1565.
- Stow, J.L., Manderson, A.P. and Murray, R.Z. (2006). SNAREing immunity: the role of SNAREs in the immune system. *Nat Rev Immunol* 6, 919-929.
- Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R. and Brunger, A.T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395, 347-353.
- Talbot, P. and Almeida, J.D. (1977). Human cytomegalovirus: purification of enveloped virions and dense bodies. *J Gen Virol* 36, 345-349.
- Tandon, R., AuCoin, D.P. and Mocarski, E.S. (2009). Human cytomegalovirus exploits ESCRT machinery in the process of virion maturation. *J Virol* 83, 10797-10807.
- Terhune, S., Torigoi, E., Moorman, N., Silva, M., Qian, Z., Shenk, T. and Yu, D. (2007). Human cytomegalovirus UL38 protein blocks apoptosis. *J Virol* 81, 3109-3123.
- Tokuyasu, K.T. (1973). A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *J Cell Biol* 57, 551-565.
- Tooze, J., Hollinshead, M., Reis, B., Radsak, K. and Kern, H. (1993). Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur J Cell Biol* 60, 163-178.
- van Meel, E. and Klumperman, J. (2008). Imaging and imagination: understanding the endo-lysosomal system. *Histochem Cell Biol* 129, 253-266.
- Varum, S.M., Streblow, D.N., Monroe, M.E., Smith, P., Auberry, K.J., Pasa-Tolic, L., et al. (2004). Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol* 78, 10960-10966.
- Wan, L., Molloy, S.S., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Rybak, S.L. and Thomas, G. (1998). PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-Golgi network localization. *Cell* 94, 205-216.
- Watson, R.T. and Pessin, J.E. (2001). Transmembrane domain length determines intracellular membrane compartment localization of syntaxins 3, 4, and 5. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C215-223.
- Yamashiro, D.J., Tycko, B., Fluss, S.R. and Maxfield, F.R. (1984). Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway. *Cell* 37, 789-800.
- Yanez-Mo, M., Alfranca, A., Cabanas, C., Marazuela, M., Tejedor, R., Ursa, M.A., Ashman, L. K., de Landazuri, M. O., Sanchez-Madrid, F. (1998). Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules CD81/TAPA-1 and CD151/PETA-3 with alpha3 beta1 integrin localized at endothelial lateral junctions. *J Cell Biol* 141, 791-804.
- Zhu, H., Cong, J.P., Mamtora, G., Gingeras, T. and Shenk, T. (1998). Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14470-14475.

